

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS - BIOQUÍMICA

**EDUARDO BALSANELLI**

**CARACTERIZAÇÃO DE FATORES MOLECULARES  
ENVOLVIDOS NA INTERAÇÃO DE *Herbaspirillum seropedicae*  
COM GRAMÍNEAS**

CURITIBA

2013

EDUARDO BALSANELLI

**CARACTERIZAÇÃO DE FATORES MOLECULARES  
ENVOLVIDOS NA INTERAÇÃO DE *Herbaspirillum seropedicae*  
COM GRAMÍNEAS**

Tese de doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências-Bioquímica.

Orientador: Dra. Rose Adele Monteiro

Co-Orientador: Dr. Emanuel M. de Souza

**CURITIBA**


**2013**


## TERMO DE APROVAÇÃO


EDUARDO BALSANELLI


### CARACTERIZAÇÃO DE FATORES MOLECULARES ENVOLVIDOS NA INTERAÇÃO DE *Herbaspirillum seropedicae* COM GRAMÍNEAS

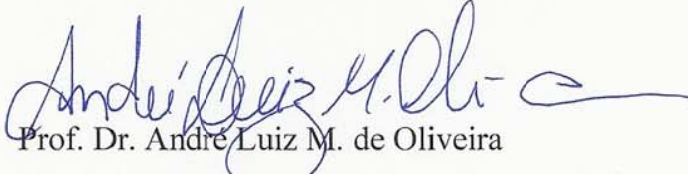
Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Curso de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:

  
Orientador: Prof. Dr. Rose Adele Monteiro  
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFPR

  
Prof. Dr. Leonardo Magalhães Cruz  
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFPR

  
Prof. Dr. Rodrigo Vassoler Serrato  
Setor Litoral, UFPR

  
Prof. Dr. Doumit Camilios Neto  
Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, UEL

  
Prof. Dr. André Luiz M. de Oliveira  
Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, UEL

Curitiba, 13 de dezembro de 2013.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	v
LISTA DE TABELAS .....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS .....	viii
RESUMO .....	xi
ABSTRACT .....	xii
1. INTRODUÇÃO .....	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	03
2.1. INTERAÇÃO PLANTA – BACTÉRIA .....	03
2.2. <i>Herbaspirillum seropedicae</i> .....	06
2.3. LIPOPOLISSACARÍDEOS .....	08
2.3.1. Biossíntese de Lipopolissacarídeos .....	13
2.4. EXOPOLISSACARÍDEOS .....	16
3. JUSTIFICATIVA .....	19
4. OBJETIVOS .....	22
5. METODOLOGIA .....	23
5.1. BACTÉRIAS .....	23
5.2. PLASMÍDEOS .....	24
5.3. CONDIÇÕES E MEIOS DE CULTIVO .....	25
5.3.1. Antibióticos .....	25
5.3.2. Manutenção das estirpes bacterianas .....	26
5.4. TÉCNICAS DE MANIPULAÇÃO DE DNA .....	27
5.4.1. Purificação de DNA genômico de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> .....	27
5.4.2. Purificação de DNA plasmidial .....	27
5.4.3. Extração de DNA a partir de gel de agarose de baixo ponto de fusão .....	28
5.4.4. Eletroforese de DNA .....	29
5.4.5. Digestão de DNA por enzimas de restrição .....	29
5.4.6. Ligação de fragmentos de DNA aos vetores .....	30
5.4.8. Amplificação de DNA .....	30
5.4.9. Sequenciamento de DNA .....	32
5.5. TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA POR ELETROPORAÇÃO .....	33

5.5.1. Preparo de células eletrocompetentes .....	33
5.5.2. Transformação bacteriana .....	34
5.6. CONJUGAÇÃO BACTERIANA .....	34
5.7. ESTUDO <i>in silico</i> DOS GENES RESPONSÁVEIS PELA SÍNTESE DE LPS E EPS DE <i>H. seropedicae</i> .....	35
5.8. OBTENÇÃO DAS ESTIRPES MUTANTES DE <i>H. seropedicae</i> .....	36
5.9. PREPARAÇÃO DO LPS DAS ESTIRPES DE <i>H. seropedicae</i> PARA ANÁLISE POR SDS-PAGE .....	37
5.10. PREPARAÇÃO DO EPS DAS ESTIRPES DE <i>H. seropedicae</i> PARA ANÁLISE POR SDS-PAGE .....	37
5.11. ENSAIOS <i>in planta</i> .....	38
5.11.1. Desinfecção da superfície das sementes .....	38
5.11.2. Cultivo de plantas em sistema hidropônico e inoculação com as estirpes de <i>H. seropedicae</i> .....	39
5.11.3. Ensaios de adesão das estirpes de <i>H. seropedicae</i> às raízes de milho ...	40
5.11.4. Ensaios de colonização endofítica das raízes de milho pelas estirpes de <i>H. seropedicae</i> .....	42
5.11.5. Ensaios de colonização epifítica das raízes de milho pelas estirpes de <i>H. seropedicae</i> .....	42
5.12. FORMAÇÃO DE BIOFILME EM FIBRA DE VIDRO .....	43
5.13. REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES DE BIOSÍNTESE DE LPS E EPS EM <i>H. seropedicae</i> .....	43
5.13.1. Determinação da atividade específica de $\beta$ -galactosidase .....	43
5.14. ANÁLISE DO PERFIL TRANSCRIPTÔMICO DE <i>H. seropedicae</i> DURANTE COLONIZAÇÃO DA RIZOSFERA.....	45
5.14.1. Extração de RNA .....	45
5.14.2. Construção das bibliotecas e sequenciamento em larga escala com SOLiD .....	46
5.14.3. Análise das sequências de cDNA produzidas .....	46
5.14.4. Validação das sequências diferencialmente expressas .....	47
5.15. IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DA MEMBRANA EXTERNA DE <i>H.</i> <i>seropedicae</i> .....	48
5.15.1. Purificação de proteínas da membrana externa de <i>H. seropedicae</i> .....	48

5.15.2. Separação de proteínas da membrana externa por SDS-PAGE .....	48
5.15.3. Identificação de proteínas de membrana externa de <i>H. seropedicae</i> por espectroscopia de massa (MALDI-TOF) .....	49
5.16. IDENTIFICAÇÃO DE RECEPTORES VEGETAIS ENVOLVIDOS NA ADESÃO BACTERIANA .....	50
5.16.1. Extração de proteínas totais de raiz de milho .....	50
5.16.2. Cromatografia de afinidade .....	51
5.17. ENSAIOS DE AGLUTINAÇÃO .....	51
<b>6. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>53</b>
6.1. ANÁLISES <i>in silico</i> DA VIA DE BIOSÍNTESE DE LPS EM <i>H. seropedicae</i> . .....	53
6.2. OBTENÇÃO DA ESTIRPE MUTANTE <i>H. seropedicae</i> EBLPS .....	57
6.3. <i>H. seropedicae</i> LPSEB ( <i>walL</i> <sup>-</sup> ) NÃO POSSUI A PORÇÃO DE ANTÍGENO-O DO LPS .....	60
6.4. A PORÇÃO DE ANTÍGENO-O DO LPS É ESSENCIAL PARA COLONIZAÇÃO DE MILHO POR <i>H. seropedicae</i> .....	62
6.5. LECTINAS DE MILHO MEDIAM A ADESÃO DE <i>H. seropedicae</i> À SUPERFÍCIE RADICULAR .....	65
6.5.1. Caracterização de lectinas de raiz de milho requeridas para adesão de <i>H. seropedicae</i> .....	70
6.6. ADESÃO DE <i>H. seropedicae</i> NAS RAÍZES DE MILHO INDUZEM A BIOSÍNTESE DE LPS .....	78
6.6.1. Obtenção das estirpes <i>H. seropedicae</i> pLig e <i>H. seropedicae</i> pTransp .....	78
6.6.2. Regulação da expressão dos genes de montagem e transporte de LPS de <i>H. seropedicae</i> .....	79
6.7. PAPEL DO LPS DE <i>H. seropedicae</i> NA INTERAÇÃO COM O HOSPEDEIRO .....	85
6.8. ANÁLISES <i>in silico</i> DA VIA DE BIOSÍNTESE DE EPS EM <i>H. seropedicae</i> . .....	87
6.9. OBTENÇÃO DA ESTIRPE MUTANTE <i>H. seropedicae</i> EBEPs .....	89
6.10. MUTAÇÃO EM <i>epsB</i> DIMINUI PRODUÇÃO DE EPS POR <i>H. seropedicae</i> .....	90
6.11. EPS DE <i>H. seropedicae</i> É NECESSÁRIO PARA FORMAÇÃO DE BIOFILME EM LÃ DE VIDRO .....	92
6.12. A COLONIZAÇÃO DE MILHO POR <i>H. seropedicae</i> NÃO É DEPENDENTE DA PRODUÇÃO DE EPS .....	96

6.13. A EXPRESSÃO DOS GENES <i>eps</i> DE <i>H. seropedicae</i> É REPRIMIDA DURANTE COLONIZAÇÃO DE MILHO E INDUZIDA DURANTE ADESÃO À FIBRA DE VIDRO .....	98
6.14. PAPEL DO EPS DE <i>H. seropedicae</i> NA INTERAÇÃO COM HOSPEDEIRO .....	100
6.15. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA EXTERNA DE <i>H. seropedicae</i> .....	103
6.16. PERFIL TRANSCRIPTÔMICO DE <i>H. seropedicae</i> DURANTE COLONIZAÇÃO DA RIZOSFERA .....	106
6.16.1. Balanço de nitrogênio durante interação com a planta .....	108
6.16.2. Uso de PHB para sobrevivência na rizosfera no início da colonização ...	113
6.16.3. Estrutura da cápsula é modificada durante interação com a planta .....	117
6.16.4. Pili tipo IV pode ser requerido para adesão na superfície radicular .....	118
6.16.5. Sensoriamento ambiental na rizosfera .....	120
6.16.6. Defesa bacteriana contra compostos químicos vegetais .....	121
6.16.7. Hidrolases e esterases induzidas em bactérias aderidas .....	122
6.17. PERFIL TRANSCRIPTÔMICO DE <i>H. seropedicae</i> NA RIZOSFERA .....	124
<b>7. CONCLUSÕES</b> .....	126
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	128
<b>ANEXOS</b> .....	152

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 –	Estrutura do envelope de bactérias gram-negativas .....	9
FIGURA 2 –	Estrutura geral dos lipopolissacarídeos bacterianos .....	10
FIGURA 3 –	Biossíntese e exportação do LPS .....	15
FIGURA 4 –	Esquema dos ensaios de avaliação da colonização de milho por <i>H. seropedicae</i> .....	40
FIGURA 5 –	Organização genômica dos genes responsáveis pela biossíntese de LPS em <i>H. seropedicae</i> .....	53
FIGURA 6 –	Via de biossíntese e modelo estrutural da porção lipídeo-A do LPS de <i>H. seropedicae</i> .....	56
FIGURA 7 –	Modelo de montagem do LPS de <i>H. seropedicae</i> .....	58
FIGURA 8 –	Perfil eletroforético do gene <i>waaL</i> amplificado das estirpes de <i>H. seropedicae</i> .....	60
FIGURA 9 –	Perfil eletroforético do LPS das estirpes de <i>H. seropedicae</i> .....	61
FIGURA 10 –	Colonização de raízes de milho pelas estirpes <i>H. seropedicae</i> selvagem (barras verde escuro) e mutante <i>waaL</i> (barras verde claro) .....	63
FIGURA 11 –	Adesão em raízes de milho por diferentes doses de inóculo de <i>H. seropedicae</i> selvagem (barras verde escuro) e mutante <i>waaL</i> (barras verde claro) .....	64
FIGURA 12 –	Efeito de competidores na adesão de <i>H. seropedicae</i> em raízes de milho .....	66
FIGURA 13 –	Colonização de raízes de milho por diferentes doses de inóculo de <i>H. seropedicae</i> selvagem (barras verde escuro) e <i>A. brasilense</i> (barras cinza) .....	68
FIGURA 14 –	Ensaio de aglutinação de <i>H. seropedicae</i> na presença de WGA .....	70
FIGURA 15 –	Eletroforese das frações de purificação de lectinas de raiz de milho por SDS-PAGE 12%.....	71
FIGURA 16 –	Modelos estruturais das lectinas de raiz de milho identificadas.	74



FIGURA 17 – Efeito de lectinas na adesão de <i>H. seropedicae</i> em raízes de milho .....	75
FIGURA 18 – Microscopia ótica de <i>H. seropedicae</i> selvagem (A) e <i>waaL</i> (B).	78
FIGURA 19 – Regulação da expressão dos genes de biossíntese de LPS de <i>H. seropedicae</i> por íons cálcio “in vitro” .....	80
FIGURA 20 – Regulação da expressão dos genes de biossíntese de LPS de <i>H. seropedicae</i> no rizoplane .....	83
FIGURA 21 – Modelo de biossíntese de EPS em <i>H. seropedicae</i> SMR1.....	88
FIGURA 22 – Perfil eletroforético do gene <i>epsB</i> amplificado de estirpes de <i>H. seropedicae</i> .....	90
FIGURA 23 – Perfil eletroforético do EPS das estirpes de <i>H. seropedicae</i> .....	92
FIGURA 24 – EPS de <i>H. seropedicae</i> é necessário para formação de biofilme em fibra de vidro.....	94
FIGURA 25 – Formação de biofilme em fibra de vidro por <i>H. seropedicae</i> .....	96
FIGURA 26 – Colonização de raízes de milho pelas estirpes selvagem (barras azul escuro) e mutante <i>epsB</i> (barras azul claro) de <i>H. seropedicae</i> .....	97
FIGURA 27 – Diminuição da produção de EPS por <i>H. seropedicae</i> não altera a capacidade de adesão em raízes de milho.....	98
FIGURA 28 – Regulação da expressão do gene <i>epsG</i> de <i>H. seropedicae</i> durante colonização do rizoplane e formação de biofilme.....	99
FIGURA 29 – Eletroforese das frações de membrana de <i>H. seropedicae</i> por SDS-PAGE 7-20%.....	103
FIGURA 30 – Metabolismo de nitrogênio de <i>H. seropedicae</i> na rizosfera.....	110
FIGURA 31 – Regulação da expressão dos genes de metabolismo de nitrogênio de <i>H. seropedicae</i> na rizosfera.....	112
FIGURA 32 – Degradação de PHB por <i>H. seropedicae</i> na rizosfera.....	114
FIGURA 33 – Colonização inicial e capacidade competitiva de <i>H. seropedicae</i> dependem do uso de PHB.....	116
FIGURA 34 – Expressão de enzimas líticas por <i>H. seropedicae</i> na rizosfera...	124

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 –	CARACTERÍSTICAS DAS ESTIRPES BACTERIANAS .....	23
TABELA 2 –	CARACTERÍSTICAS DOS PLASMÍDEOS .....	24
TABELA 3 –	ANTIBIÓTICOS UTILIZADOS NOS CULTIVOS.....	26
TABELA 4 –	PRIMERS .....	31
TABELA 5 –	IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS TIPO-LECTINA ISOLADAS DE RAIZ DE MILHO (MRL) POR SPECTROSCOPIA MALDI- TOF.....	73
TABELA 6 –	IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS DE MEMBRANA EXTERNA DE <i>H. seropedicae</i> POR ESPECTROSCOPIA MALDI-TOF.....	104
TABELA 7 –	DADOS DA ANÁLISE TRANSCRIPTÔMICA.....	108

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Ara4N – 4-amino-4desoxi- L-arabinose

Ac – Acetil

d.a.i. – dias após inoculação

D.O.<sub>600</sub> – Absorbância em 600 nanômetros

EDTA – Ácido etilenodiaminotetraacético

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

EPS – Exopolissacarídeo

FBN – Fixação biológica de nitrogênio

Gal – D-galactose

Glc – D-glucose

GlcNAc – N-acetil-glucosamina

Hep – L-glicero-D-mano-heptose

Kdo – Ácido D-glicero-D-talo-3-desoxi-cetooctulosônico

LCO – Lipoquitooligossacarídeo

LC-MS – Cromatografia líquida acoplada a espectroscopia de massa

LPS – Lipopolissacarídeo

Man – manose

MRL – “Maize root lectin”

PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida

PGPR – “Plant growth promoting rhizobacteria”

PHB – Poli-hidroxibutirato

P<sub>i</sub> – Fosfato inorgânico

PMF – “Peptide mass fingerprint”

Rha – ramnose

TRIS – Aminometilidenotrimetanol

UDP-GlcN – Uridildifosfato - glucosamina

WGA – “Wheat germ agglutinin”

## RESUMO

*Herbaspirillum seropedicae* é uma beta-proteobactéria encontrada em associação com várias plantas economicamente importantes e pode promover o aumento do crescimento e produtividade vegetal. Este estímulo efetivo do crescimento vegetal depende de uma colonização eficiente da planta hospedeira. A associação com o hospedeiro inicia-se com a adesão da bactéria à superfície radicular, seguida de colonização de pontos de emergência de raízes secundárias e penetração através de descontinuidades da epiderme. Ocorre então uma rápida ocupação dos espaços intercelulares, procedendo com colonização do xilema e porções aéreas. Entretanto, a natureza molecular da colonização não está claramente compreendida. Nestas associações, o evento chave parece ser a colonização da rizosfera. Portanto, a identificação e análise dos produtos gênicos envolvidos na colonização de bactérias promotoras do crescimento vegetal (PGPRs) como *H. seropedicae* em plantas tem importância científica e interesse econômico para potencializar sua aplicação. Assim, este trabalho descreve que o lipopolissacarídeo de *H. seropedicae* atua como molécula de ancoragem em lectinas radiculares durante adesão, e que o exopolissacarídeo atua como matriz na formação de biofilme em superfícies abióticas. Outros fatores moleculares foram também identificados por análise transcriptômica dessa bactéria durante colonização de milho, discriminando as adaptações moleculares de *H. seropedicae* para perceber o ambiente, aderir à superfície radicular e sobreviver nos primeiros estágios da colonização da rizosfera.

Palavras-chave: *H. seropedicae*, LPS, EPS, rizosfera, transcriptoma

## ABSTRACT

*Herbaspirillum seropedicae* is a betaproteobacteria found in association with several crops and can promote plant growth and increase productivity. This effective stimulus of plant growth depends on an efficient colonization of the host plant. The association with the host begins with the bacterial attachment onto the root surface, followed by the colonization on points of secondary root emergency and penetration through epidermis discontinuities. A rapid occupation of intercellular spaces then occurs, proceeding with xylem and aerial portions colonization. However, the molecular nature of the colonization is not clearly understood. In these associations, the key event seems to be the rhizosphere colonization. Therefore, the identification and characterization of genic products involved in the plant colonization by plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) such as *H. seropedicae* has scientific importance and economic interest to potentiate its application. This way, this work describes that the *H. seropedicae* lipopolysaccharide act as anchoring molecule to radicular lectins during attachment and that the exopolysaccharide act as matrix in biofilm formation on abiotic surfaces. Other molecular factors were also identified by transcriptomic analyses of bacteria during maize colonization, discriminating the molecular adaptations of *H. seropedicae* when perceiving the environment, attaching onto root surface and surviving in the first stages of rhizosphere colonization.

Keywords: *H. seropedicae*, LPS, EPS, rhizosphere, transcriptome

## 1. INTRODUÇÃO

O nitrogênio é um dos principais fatores limitantes do crescimento vegetal. O ganho na produtividade de grãos após a revolução verde foi consequência principalmente do uso de enormes quantias de pesticidas e fertilizantes químicos. A produção e uso destes fertilizantes, no entanto, causam grandes danos ambientais. Sua produção requer um grande consumo de combustíveis fósseis, que além de ser um recurso não renovável, apresenta alto custo e geram um grande passivo ambiental. Quando aplicados no solo, mais da metade é perdido através de desnitrificação, volatilização da amônia e lixiviação, podendo inclusive contaminar lençóis freáticos, representando um risco à saúde humana (STOLTZFUS, 1997). Além disso, grandes quantias de fertilizante nitrogenado aplicadas no solo podem induzir a formação de óxido nitroso ( $N_2O$ ), um gás com efeito estufa que também contribui para a destruição da camada de ozônio (STOLTZFUS, 1997; LADHA & REDDY, 2003). Uma alternativa ao uso de fertilizantes químicos nitrogenados é a exploração da fixação biológica de nitrogênio (FBN) realizada por bactérias associadas às culturas de plantas de interesse agrícola (WU *et al.*, 1995; LADHA & REDDY, 2003).

A FBN é uma alternativa concreta para suprir nitrogênio para as plantas. A aplicação mais bem sucedida da FBN é a inoculação de soja com *Bradyrhizobium japonicum*, uma bactéria que forma uma associação simbiótica capaz de suprir todo o nitrogênio necessário para o desenvolvimento vegetal com alta produtividade (KEYSER & LI, 1992; KANEKO *et al.*, 2002). Estender os benefícios da FBN para não-

legumes é de grande interesse, uma vez que gramíneas como arroz (*Oryza sativa*), trigo (*Triticum aestivum*) e milho (*Zea mays*) são cereais de extrema importância para o consumo humano.

Experimentos em campo mostraram que a inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* fornece pelo menos 15% do nitrogênio requerido pelo arroz (BALDANI *et al.*, 2000). A média mundial do preço da tonelada de uréia, um fertilizante nitrogenado químico muito comum, é cerca de 400 dólares. O cultivo de milho, trigo e arroz requer em média 80 Kg de uréia por hectare por safra, e a área global cultivada com estas plantas é de aproximadamente 700 milhões de hectares (de acordo com os relatórios de 2009 de [www.usda.gov](http://www.usda.gov); [www.agricultura.gov.br](http://www.agricultura.gov.br); [ec.europa.eu/agriculture](http://ec.europa.eu/agriculture)). Assim, a substituição de 15% da uréia pelo uso de bactérias fixadoras de nitrogênio, ou diazotrofos, como *H. seropedicae* poderia economizar 3,4 bilhões de dólares por safra (MONTEIRO *et al.*, 2012). Desta forma, o uso e melhoria desta promissora biotecnologia agrícola como inoculante proveria uma enorme vantagem econômica e ambiental.

Um inoculante eficiente estimula o crescimento vegetal não apenas como consequência da fixação de nitrogênio, mas também pela produção de fitohormônios, controle direto e indireto de patógenos e pelo aumento da biodisponibilidade de minerais (MONTEIRO *et al.*, 2012; BHATTACHARYYA & JHA, 2012). *H. seropedicae* tem o potencial genético de prover muitos destes benefícios (PEDROSA *et al.*, 2011). A capacidade de induzir o crescimento vegetal depende intimamente da sua interação com o hospedeiro. Desta forma, a compreensão dos mecanismos de colonização é



importante para esclarecer as etapas envolvidas na interação planta-bactéria, visando, além do acúmulo de conhecimento científico, a utilização da FBN como prática de manejo na agricultura comercial.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. INTERAÇÃO PLANTA-BACTÉRIA

Praticamente todas as plantas vivem em íntima associação com microrganismos, os quais podem colonizar sua superfície (colonização epifítica) ou ocupar espaços em tecidos internos (colonização endofítica) (BRENCIC & WINANS, 2005). As plantas podem estabelecer associações com várias bactérias diazotróficas, sendo que todas ou algumas destas bactérias podem ser responsáveis pelo suprimento de nitrogênio fixado à planta (DÖBEREINER *et al.*, 1992; BARRAQUIO *et al.*, 1982; LADHA & REDDY, 1995; MALIK *et al.*, 1997). Entre vários diazotrofos com potencial uso como biofertilizantes, bactérias com a capacidade de desenvolver populações endofíticas são foco de crescente interesse. Essas populações formam associações estáveis com plantas de importância comercial e ocupam nichos da planta nos quais têm acesso aos nutrientes necessários para fixação de nitrogênio e provavelmente protegidos contra excesso de oxigênio (HALLMANN *et al.* 1997; SANTI *et al.*, 2013). Além disso, o potencial dos chamados diazotrofos endofíticos como *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Azoarcus* sp., *Azospirillum brasilense* e

*Herbaspirillum seropedicae*, é maior pela sua ocorrência em diversos tecidos da planta, juntamente com evidências de fixação de nitrogênio *in planta* (JAMES & OLIVARES, 1998; REINHOLD-HUREK & HUREK, 1998). *H. seropedicae* coloniza e expressa genes *nif* em várias gramíneas, incluindo arroz, trigo, sorgo e milho (JAMES & OLIVARES, 1998; RONCATO-MACCARI *et al.*, 2003).

Um inoculante eficiente estimula o crescimento vegetal não apenas como consequência da fixação de nitrogênio (ELBELTAGY *et al.*, 2001; HUREK *et al.*, 2002; INIGUEZ *et al.*, 2004), mas também pela produção de fitohormônios, controle de fitopatógenos ou por aumentar disponibilidade de minerais (STURZ *et al.*, 2000; SESSITSCH *et al.*, 2002; BHATTACHARYYA & JHA, 2012). *H. seropedicae* tem o potencial genético para produzir vários destes benefícios (PEDROSA *et al.*, 2011), e mostrou-se capaz de aumentar o crescimento vegetal e produtividade de várias plantas de interesse econômico (BODDEY *et al.*, 1995; ELBELTAGY *et al.*, 2001; GYANESHWAR *et al.*, 2002; RONCATO-MACCARI *et al.*, 2003).

O estímulo efetivo do crescimento vegetal e a fixação de nitrogênio *in planta* dependem de uma colonização eficiente. Entretanto, os mecanismos da colonização pelo endófito associativo não são claramente compreendidos, devido em parte à dispersão da bactéria por toda a planta. Esta situação contrasta, por exemplo, com a colonização localizada que ocorre na simbiose rizóbio - leguminosa, na qual a bactéria fica confinada em estruturas morfo-genéticas (nódulos) desenvolvidas com a finalidade específica de abrigar as células colonizadoras (HALVERSON & STACEY, 1986; PÜHLER *et al.*, 2004). Essa colonização de rizóbios em leguminosas inicia-se

pela quimiotaxia da bactéria em direção às raízes, decorrente da liberação de flavonóides na rizosfera. Estes flavonóides também induzem a expressão de fatores de nodulação (fatores Nod) pela bactéria, causando a secreção de lipoquitooligossacarídeos (LCO). Essas macromoléculas, por sua vez, são reconhecidas por receptores protéicos vegetais (LIMPENS *et al.*, 2003), que desencadeiam alterações celulares nas raízes em contato com as bactérias, levando à formação do cordão de infecção. Após a internalização dos rizóbios, ocorre a formação do simbiossomo, com a diferenciação das bactérias em bacteróides dedicados exclusivamente à fixação de nitrogênio. Durante todos esses passos do processo de colonização, a comunicação da bactéria com o hospedeiro depende de diversas biomoléculas, dentre elas exopolissacarídeos (EPS), polissacarídeos capsulares (KPS), sistemas de secreção de proteínas (SSP) e lipopolissacarídeos (LPS) (MARIE *et al.*, 2004; BROUGHTON *et al.*, 2006; LE QUÉRÉ *et al.*, 2006).

Para que um microrganismo associativo endofítico seja capaz de colonizar as raízes das plantas intercelularmente é necessário primeiramente que seja capaz de superar os mecanismos de defesa da planta (QUISPEL, 1992; SANTI *et al.*, 2013). Contudo, tanto nas interações associativas como nas simbióticas, o evento chave parece ser a colonização do rizoplasma (PÜHLER *et al.*, 2004). Dentre os estágios deste processo estão a percepção da planta pelo microrganismo, a quimiotaxia em direção à raiz, a aderência e a colonização da superfície da mesma. *Pseudomonas fluorescens* exibe quimiotaxia em resposta a exudatos de plantas, como flavonóides, que são considerados dirigentes da interação planta-microrganismo (DE WEERT *et*

*al.*, 2002). A adesão e colonização de raízes de milho por *Azospirillum brasilense* exigem a presença do flagelo, biossíntese de lipopolissacarídeos e polissacarídeos fibrilares, além da secreção de exopolissacarídeos (BURDMAN, OKON & JURKEVITCH, 2000; JOFRÉ *et al.*, 2004).

Qualquer que seja o tipo da interação planta-bactéria, o crescimento e a sobrevivência do microrganismo em diversas partes do hospedeiro necessita de respostas adaptativas por parte da bactéria. Esta e outras pressões seletivas parecem ter direcionado a evolução de sistemas especializados de regulação que controlam a expressão dos fatores de colonização (MILLER, MEKALANOS & FALKOW, 1989; SANTI *et al.*, 2013). O controle da colonização da planta por bactérias endofíticas provavelmente envolve a interação molecular de produtos gênicos de origem vegetal e bacteriana. Portanto, a identificação e análise dos genes envolvidos na colonização de diazotrofos endofíticos em plantas de interesse econômico são importantes para aplicação da FBN nestas culturas.

## 2.2. *Herbaspirillum seropedicae*

*H. seropedicae*, pertencente à classe  $\beta$  do filo Proteobacteria, é um microorganismo diazotrófico e endofítico facultativo encontrado associado com várias plantas de interesse econômico como milho (*Zea mays*), arroz (*Oryza sativa*), sorgo (*Sorghum bicolor*), trigo (*Triticum aestivum*), cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), bananeiras (*Musa* sp.), palmeiras (*Euterpe edulis*) e abacaxizeiros (*Ananas comosus*)

(BALDANI *et al.*, 1986; BALDANI *et al.*, 1992; CRUZ *et al.*, 2001; MONTEIRO *et al.*, 2012).

A associação de *H. seropedicae* com gramíneas aparentemente inicia-se com a adesão da bactéria à superfície radicular, seguida de colonização dos pontos de emergência das raízes secundárias e penetração por descontinuidades da epiderme. Ocorrem então rápida colonização e ocupação de espaços intercelulares da raiz, assim como de aerênquima, xilema e, finalmente, partes aéreas (JAMES, 1997; RONCATO-MACCARI *et al.*, 2003; MONTEIRO *et al.*, 2008).

Gyaneshwar e colaboradores (2002) demonstraram que a colonização de *H. seropedicae* em variedades de arroz tolerante a alumínio aumentou significativamente o crescimento vegetal e o acúmulo de nitrogênio. Estas plantas apresentam uma maior exsudação de ácidos carboxílicos, favorecendo o crescimento de *H. seropedicae*. Baldani e colaboradores (1995) inocularam diferentes estirpes desta bactéria em sementes de arroz e observaram aumento de pelo menos 30% do nitrogênio total acumulado pela planta. O uso de estirpes de *H. seropedicae* imunomarcadas ou com genes repórteres revelou que a bactéria expressa os genes *nif* ao colonizar raízes e partes aéreas de arroz (JAMES *et al.*, 2002; RONCATO-MACCARI *et al.*, 2003), indicando que este endófito é capaz de fixar nitrogênio *in planta*. Por essa razão, esta bactéria apresenta grande potencial para ser utilizada como biofertilizante em gramíneas (DÖBEREINER *et al.*, 1994; JAMES *et al.*, 1997; OLIVARES *et al.*, 1996; PEDROSA *et al.*, 2011).

Genes potencialmente envolvidos na interação planta-*H. seropedicae* foram identificados na anotação da sequência genômica de *H. seropedicae* estirpe SmR1 (Z78 Sm<sup>R</sup>)(PEDROSA *et al.*, 2011). Foram encontrados genes envolvidos na biossíntese de ácido indol-acético e giberelinas, sistemas de secreção do tipo 3 e 6, flagelo, *pilli* tipo 4, exopolissacarídeos, lipopolissacarídeos e adesinas. Estruturas do envelope bacteriano como lipopolissacarídeos, exopolissacarídeos, flagelos e adesinas constituem a primeira estrutura de contato com o hospedeiro, e podem ser requeridas para a adesão da bactéria na superfície radicular do hospedeiro. Assim, a caracterização destes fatores em *H. seropedicae* SmR1 deve permitir um melhor entendimento dos mecanismos moleculares de sua associação com plantas.

### 2.3. LIPOPOLISSACARÍDEOS

Nas células bacterianas, a parede celular protege o protoplasma de choques mecânicos e osmóticos. A parede celular também atua como uma barreira física, impedindo que muitos compostos deletérios atinjam a superfície da membrana plasmática, diminuindo o estresse químico sobre a célula (TORTORA *et al.*, 2005). Apesar da aparente função de proteção inerte, a parede celular possui papel ativo na regulação e captação de moléculas pela célula e no reconhecimento celular por outros organismos (SINGLETON, 1992). A estrutura básica da parede celular bacteriana é formada por moléculas de peptideoglicano, as quais recobrem toda superfície celular como uma rede de polissacarídeos ligados por pontes peptídicas, conferindo grande

rigidez à estrutura (GLASER, 1973). A parede celular de bactérias gram-negativas apresenta uma fina camada de peptidoglicano e uma membrana externa a esta camada (Fig. 1), mantidos unidos por ligações não-covalentes. Esta membrana é descrita como envelope celular e apresenta em sua composição proteínas, fosfolípídeos, lipoproteínas e lipopolissacarídeos (LPS). As moléculas de LPS representam aproximadamente 60% do peso seco desta membrana, e aproximadamente 1% do peso seco total da bactéria (COLLINS & FERRIER, 1995).

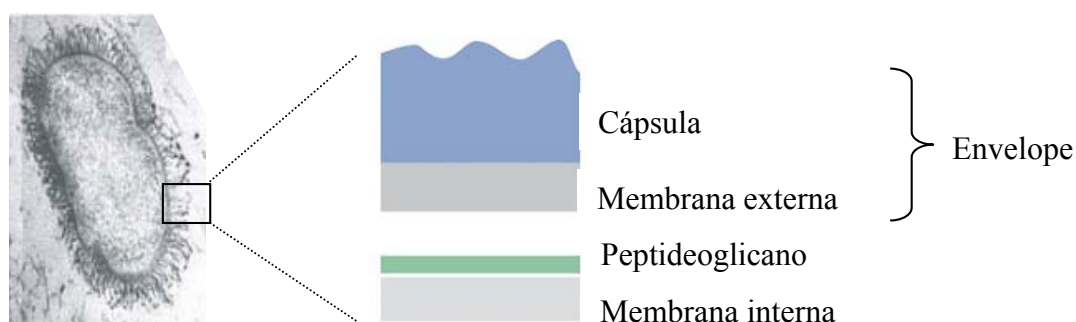


FIGURA 1 – ESTRUTURA DO ENVELOPE DE BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS. À esquerda, eletromicrografia de *Escherichia coli* K30 marcada com ferritina cationizada, e à direita, esquema da organização do envelope bacteriano (modificado de WHITFIELD, 2006).

Os LPS são macromoléculas de estrutura extremamente complexa, encontrados exclusivamente formando a monocamada da membrana externa de bactérias gram-negativas (COLLINS & FERRIER, 1995). Esses glicoconjugados são formados por três regiões estruturalmente distintas: a porção denominada lipídeo-A, o núcleo oligossacarídico e o antígeno-O (Fig. 2) (SUTHERLAND, 1985).

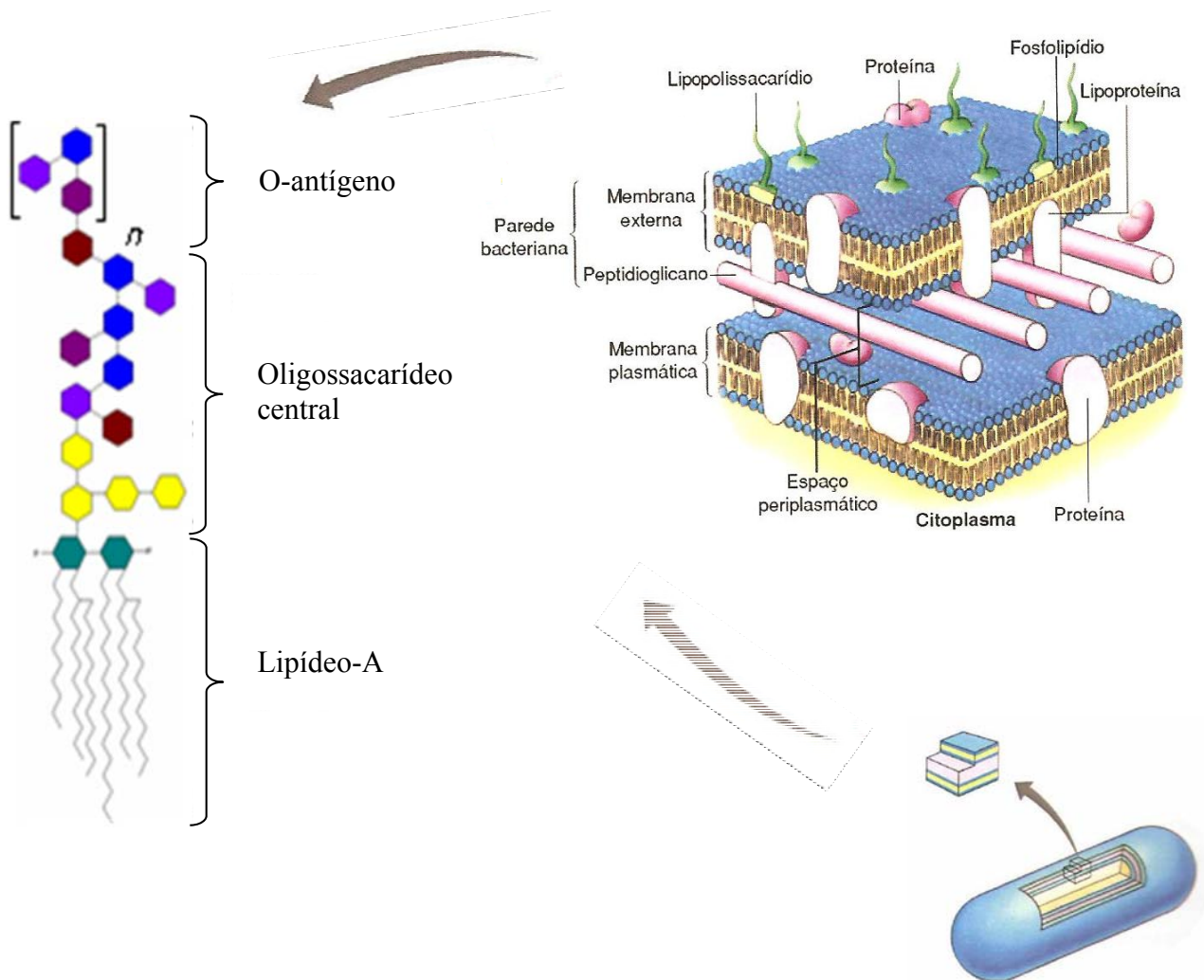


FIGURA 2 – ESTRUTURA GERAL DOS LIPOPOLISSACARÍDEOS BACTERIANOS. À direita, esquema do envelope bacteriano (modificado de TORTORA *et al.*, 2006) e posicionamento do LPS, e à esquerda, esquema da estrutura do LPS. Hexágonos indicam diferentes monossacarídeos.

O lipídeo-A é a porção lipídica do LPS, responsável por ancorar toda a estrutura na membrana externa das bactérias. Esta porção é estruturalmente



conservada entre as classes de bactérias, sendo composta de duas unidades de 2-amino-2-deoxi-D-glucose (GlcN) ligadas entre si por ligações do tipo  $\beta$ -(1→6) e fosforiladas nas posições 1 e 4', além de apresentarem substituições por ácidos graxos de cadeia longa nas demais posições (ZÄHRINGER *et al.*, 1999). A ligação entre o lipídeo-A e o núcleo oligossacarídico é realizada normalmente por uma unidade de ácido 3-deoxi-D-mano-oct-2-ulosônico (Kdo), ligado ao C-6 livre de uma das GlcN (RAETZ & WHITFIELD, 2002). O núcleo oligossacarídico pode ser dividido em núcleo interno, composto pelo Kdo e heptoses, e em núcleo externo, composto de hexoses piranosídicas (JANNSON *et al.*, 1981; RAETZ, 1990). O antígeno-O é geralmente constituído de unidades oligossacarídicas repetitivas. Diferentes níveis de polimerização produzem cadeias com massas moleculares regularmente diferentes, fenômeno constantemente observado pelo padrão de bandas na análise eletroforética de LPS (ERRIDGE *et al.*, 2002). Essas cadeias polissacarídicas de composição e estrutura espacial extremamente variável projetam-se a partir da membrana externa da bactéria para o meio ambiente, constituindo a superfície molecular que realiza o primeiro contato com um possível hospedeiro. Devido a esta característica, os LPS exercem uma importante função nos processos de reconhecimento e comunicação celular (KANNENBERG *et al.*, 1998).

Em *Pseudomonas syringae*, a perda ou alteração da estrutura do antígeno-O está relacionada com a perda da virulência (SMITH *et al.*, 1994). Alterações nesta porção do LPS em *Pseudomas putida* diminuem drasticamente a colonização de plantas de batata (WEGER *et al.*, 1989). Alguns trabalhos sugerem que os LPS estão

envolvidos no processo de adesão de *Agrobacterium tumefaciens* às células hospedeiras (PUEPPKE, 1984; MATHYSSE, 1986). Mutantes desta bactéria que produzem um LPS com núcleo alterado, mas que sintetizam a porção antígeno-O sem defeitos, são capazes de aderir normalmente às células de cenoura (METTS *et al.*, 1991), mostrando que a estrutura total do LPS não é fundamental para o processo. A nodulação de leguminosas durante a simbiose com rizóbios parece ser alterada na ausência de LPS intactos (CARLSON *et al.*, 1995; MAAGD *et al.*, 1998). A própria expressão do LPS nessas bactérias parece ser modulada simbioticamente, sendo que vários polissacarídeos são modificados durante a transição de células de vida livre para bacteróides (BROUGHTON *et al.*, 2006). Estas mudanças podem ser induzidas por extratos de plantas, principalmente por flavonóides encontrados em tais extratos (DUELLI *et al.*, 1997). Rizóbios mutantes na produção de LPS permanecem nos cordões de infecção, sem diferenciarem-se em bacteróides fixadores de nitrogênio (NOEL *et al.*, 1986), não completando o desenvolvimento dos nódulos em diversos legumes (NOEL *et al.*, 1986; CAMPBELL *et al.*, 2002; BROUGHTON *et al.*, 2006). Esses resultados sugerem que alterações nos LPS de rizóbios não afetam os primeiros estágios da colonização, como o enrolamento do pêlo radicular e formação do cordão de infecção, mas afetam a manutenção da viabilidade celular no interior da planta (KANNENBERG *et al.*, 1998; NOEL *et al.*, 2000). Além disso, os bacterióides dentro dos nódulos apresentam variações drásticas na estrutura do LPS em relação às células antes da infecção, como demonstrado *in situ* para os LPS de *R. leguminosarum* durante a simbiose com *Pisum sativum*, *Vicia sativa* e *Phaseolus*

*vulgaris* (KANNENBERG *et al.*, 1994; GOOSEN-DEROO *et al.*, 1991). Bacteróides de *R. etli* de nódulos de *Phaseolus vulgaris* (TAO *et al.*, 1992), e de *Sinorhizobium meliloti* de alfafa (REUHS *et al.*, 1999) apresentaram diferenças estruturais na porção antígeno-O do LPS similares às aquelas observadas quando essas bactérias são cultivadas em baixos níveis de oxigênio e baixo pH, indicando que mudanças estruturais na porção de antígeno-O do LPS podem ser uma consequência das condições fisiológicas a que as células estão expostas nos nódulos (KANNENBERG *et al.*, 1998). Mutantes de *R. etli* que produzem uma estrutura truncada de LPS formam nódulos defeituosos e não fixam nitrogênio (NOEL e DUELLI, 2000). Esses dados indicam que o grau de alteração estrutural do LPS influencia as chances de sobrevivência dos bacterióides e o efetivo desenvolvimento de um nódulo ativo (CARLSON *et al.*, 1995; RIDLEY, 2000).

#### 2.3.1. Biossíntese de lipopolissacarídeos

A biossíntese da porção lipídeo-A é iniciada pela ligação consecutiva de dois ácidos graxos (geralmente decanoil) à UDP-GlcN. Esta molécula, denominada de lipídeo-X, é condensada com um segundo lipídeo-X, formando a estrutura básica do lipídeo-A. As duas GlcN ligadas  $\beta(1-6)$  são N-substituídas por ácidos graxos e O-ligadas ao primeiro monossacarídeo do oligossacarídeo central, geralmente um Kdo (RAETZ, 1990).

A reação inicial da biossíntese do antígeno-O envolve uma ligação éster entre GlcNAc ou GalNAc ao ácido graxo undecaprenil-PP (Fig. 3). Essa molécula serve de suporte inicial para a ligação de NTP-açúcares por glucosiltransferases ancoradas na face citosólica da membrana interna. Após formação de uma unidade oligossacarídica ligada ao Und-PP, a molécula é translocada para a face periplasmática da membrana interna com o auxílio da proteína Wzx (antígeno-O flipase) (Fig. 3.1). As unidades oligossacarídicas do antígeno-O são então polimerizadas pela antígeno-O polimerase (Wzy), e o produto é transferido ao lipídeo-A ligado ao oligossacarídeo central pela antígeno-O ligase. A biossíntese da porção de oligossacarídeo central ainda é incerta, porém sabe-se que a proteína MsbA é necessária para o deslocamento do lipídeo-A ligado ao oligossacarídeo central da face citosólica para a face periplasmática da membrana interna (Fig. 3.2). A proteína periplasmática LptA, juntamente com as proteínas YrbK e LptB, podem agir como auxiliadoras no direcionamento da molécula de LPS para o transportador Imp/RlpB, que desloca o LPS para a face externa da membrana externa (VALVANO, 2003; RAETZ *et al.*, 2007).

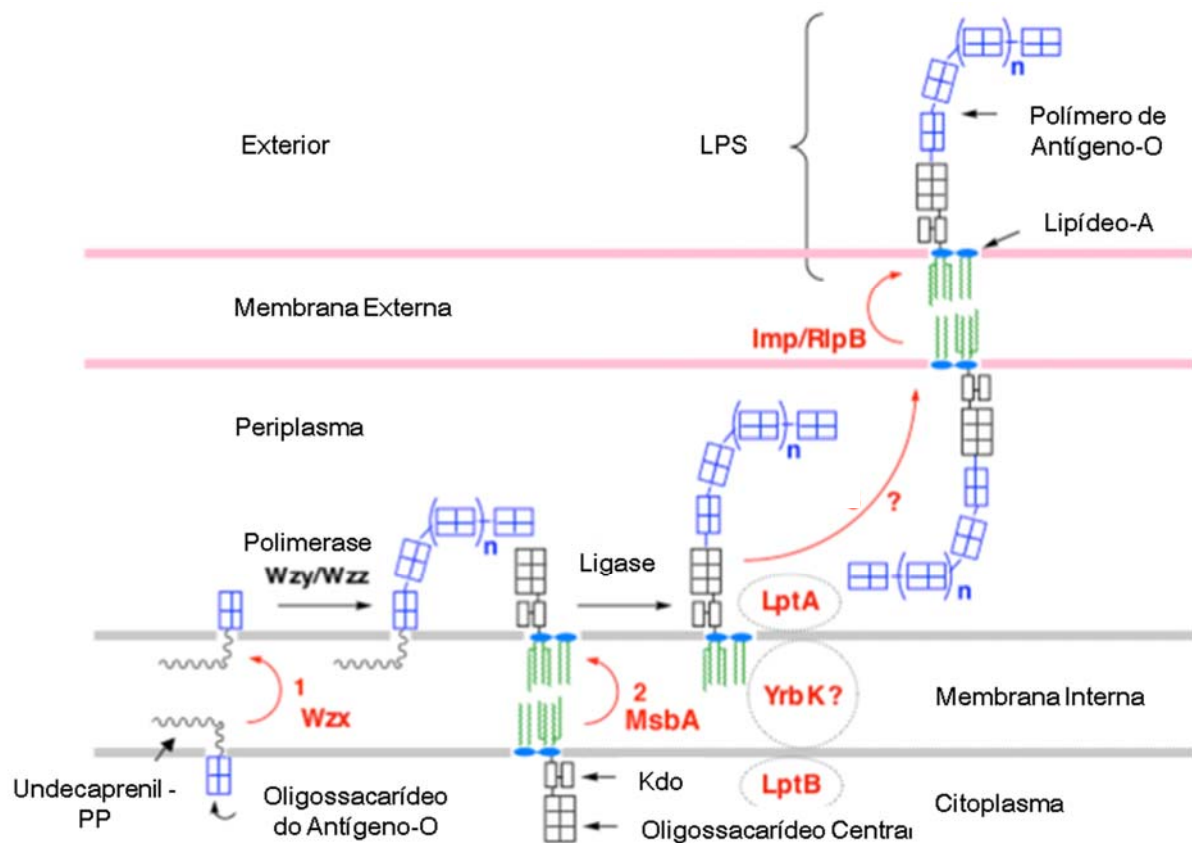


FIGURA 3 – BIOSÍNTESE E EXPORTAÇÃO DO LPS. Proteínas envolvidas na biossíntese do LPS são mostradas em preto, e as proteínas envolvidas no transporte do LPS são mostradas em vermelho. Modificado de RAETZ *et al.*, 2007. (1) Translocação da unidade polimérica de antígeno-O através da membrana interna. (2) Translocação da molécula lipídeo-A – oligossacarídeo central através da membrana interna.

As alterações estruturais no LPS podem ser ocasionadas pelo impedimento de sua exportação para a membrana externa, inibição da polimerização do antígeno-O ou mutagênese das vias de biossíntese dos monossacarídeos capsulares.

Balsanelli e colaboradores (2010) construíram estirpes mutantes de *H. seropedicae* SmR1 nos genes *rfbB* e *rfbC*, envolvidos na biossíntese de ramnose.

Este monossacarídeo é um dos principais constituintes do LPS da estirpe parental SmR1 de *H. seropedicae*. A mutação nos genes *rfb* alterou drasticamente a composição e estrutura do LPS de *H. seropedicae* SmR1, e como consequência diminuiu a capacidade de adesão e colonização endofítica desta bactéria. Contudo, a deficiência na produção de ramnose acarretou em efeitos pleiotrópicos à alteração do LPS, como diminuição da taxa de crescimento. Uma vez que esse monossacarídeo poderia participar da biossíntese de outros polissacarídeos, ou ainda de processos metabólicos não conhecidos, os efeitos observados na interação com o hospedeiro poderiam ser causados por outros fatores além do LPS.

#### 2.4. EXOPOLISSACARÍDEOS

Exopolissacarídeos (EPS) são polímeros de carboidratos encontrados no exterior das células, com composição e estrutura altamente variáveis (SUTHERLAND, 1980). Os EPS bacterianos são geralmente responsáveis pela adesão das células tanto a superfícies sólidas como com outras bactérias, formando agregados (COSTERTON *et al.*, 1995). A existência de uma matriz entre células confere uma série de vantagens seletivas, como proteção contra variações bruscas do ambiente, retenção de íons e nutrientes (COSTERTON *et al.*, 1995), resistência à dessecação (ROBERSON & FIRESTONE, 1992) e proteção mecânica (SUTHERLAND, 1982). Agregados celulares organizadamente formados são chamados de biofilmes (COSTERTON *et al.*, 1995). Estas comunidades apresentam uma organização básica

na qual microrganismos associados a uma superfície crescem em microcolônias inclusas em matriz e separadas por uma rede de canais de água (STOODLEY *et al.*, 2002; STEWART & FRANKLIN, 2008). A formação inicial de biofilme pode ocorrer pela redistribuição de células aderidas por motilidade na superfície (DALTON *et al.*, 1996; KORBER *et al.*, 1995; O'TOOLE & KOLTER, 1998), por divisão binária de células aderidas (HEYDORN *et al.*, 2000) ou pelo recrutamento de células do fluido circundante para o desenvolvimento do biofilme (TOLKER-NIELSON *et al.*, 2000). As células individuais aderentes que iniciam a formação de biofilme são capazes de movimento independente (O'TOOLE & KOLTER, 1998), até que comecem a exudar exopolissacarídeos e ancoram irreversivelmente (STOODLEY *et al.*, 2002). A próxima fase do desenvolvimento do biofilme, maturação, resulta na geração de uma arquitetura complexa com canais, poros e redistribuição tridimensional da colônia em oposição ao substrato (DAVIES *et al.*, 1998). Enquanto o biofilme amadurece muitas células alteram seus processos fisiológicos em resposta às condições particulares em seus nichos. As células do biofilme expressam genes em um padrão profundamente diferente de seus contrapontos planctônicos (SAUER *et al.*, 2002). Finalmente, indivíduos ou microcolônias inteiras podem emergir do biofilme para colonizar outras superfícies (HALL-STOODLEY *et al.*, 2004).

A maioria dos microrganismos não ocorre naturalmente em comunidades planctônicas, sendo geralmente encontrados aderidos à superfícies, formando biofilmes (SUTHERLAND, 2001). Assim, uma das funções dos EPS na interação planta-bactéria seria possibilitar a colonização epifítica do hospedeiro vegetal. Outra

possível função é descrita na interação de fitopatógenos com seus hospedeiros. Durante o processo de infecção, os EPS, geralmente hidrofílicos, criam um ambiente favorável ao crescimento do patógeno no interior da planta infectada, agindo como barreira protetora contra metabólitos de defesa vegetal (LEIGH & COPLIN, 1992). A mutagênese da biossíntese de EPS (genes *exo* ou *eps*) resulta na perda dos sintomas provocados por *Erwinia stewartii* e *Xanthomonas axopodis* em seus hospedeiros (DENNY, 1995). A mutação no gene *gumD* de *Xanthomonas campestris*, que codifica para uma glucosiltransferase envolvida na biossíntese de EPS, diminui drasticamente a patogenicidade deste organismo (CHOU *et al.*, 1997). O EPS foi descrito como principal fator de virulência requerido para causar murcha bacteriana por *Ralstonia solanacearum* (HAYWARD, 1991), ao interferir no transporte de água na planta por entupir os vasos de xilema.

No caso de diazotrofos simbiotes, o EPS parece ser indispensável para o estabelecimento de nódulos funcionais (LEIGH & WALKER, 1994; SKORUPSKA *et al.*, 2006). Em *Rhizobium meliloti*, mutantes deficientes na produção de um tipo de EPS induzem a formação de nódulos, porém estes não contêm bacteroides, não ocorrendo fixação de nitrogênio (LEIGH *et al.*, 1987; LONG *et al.*, 1988). A mutação da biossíntese do EPS ácido de *Rhizobium* sp. NGR234 também acarreta na formação destes pseudonódulos (STAEHELIN *et al.*, 2006). A infecção e subsequente nodulação de legumes por *R. leguminosarum* requer a adesão da bactéria nos pelos radiculares, processo este finalizado com produção de EPS (LAUS *et al.*, 2005).



No caso dos diazotrofos associativos, os EPS parecem influenciar a agregação celular e formação de biofilme na superfície radicular das plantas (BURDMAN *et al.*, 2000; STEENHOUDT & VANDERLEYDEN, 2000). Após um estágio inicial de adesão fraca à superfícies sólidas, bactérias como *Pseudomonas* e *Azospirillum* aderem firmemente através de exopolímeros de ancoragem (MICHIELIS *et al.*, 1991; VANDEVIVERE & KIRSHMAN, 1993). Mutações em genes envolvidos na biossíntese de ramnose em *A. brasilense* causam, entre outras coisas, diminuição na produção de EPS, acarretando na diminuição na colonização de milho (JOFRE *et al.*, 2004). Não existem evidências da função do EPS de *H. seropedicae* na colonização de plantas, embora análises de microscopia eletrônica de varredura mostraram *H. seropedicae* produzindo materiais mucilaginosos e fibrilares durante colonização de superfície radicular de milho e sorgo (RONCATO-MACCARI *et al.*, 2003), que podem ser EPS.

### 3. JUSTIFICATIVA

*H. seropedicae* coloniza gramíneas endofiticamente e epifiticamente. Esta colonização inicia com a quimiotaxia da bactéria em direção às raízes, seguida de adesão na superfície radicular. Uma população epifítica começa então a desenvolver-se, juntamente com a penetração de algumas bactérias nos tecidos internos e consequente desenvolvimento de uma população endofítica (revisado por MONTEIRO *et al.*, 2012). Gyaneshwar *et al.* (2002) e Reddy *et al.* (2002) mostraram

que a fixação de nitrogênio em arroz inoculado com *H. seropedicae* Z67 foi predominantemente devido às bactérias da superfície radicular. Por outro lado, *H. seropedicae* também expressa genes *nif* e a enzima nitrogenase nos tecidos internos da planta (OLIVARES *et al.*, 1997; EBELTAGY *et al.*, 2001; JAMES *et al.*, 2002; RONCATO-MACCARI *et al.*, 2003). Esses dados indicam que ambas populações podem ser importantes na estimulação do crescimento vegetal. Contudo, esta estimulação depende de uma colonização eficiente da planta, e a colonização da rizosfera parece ser uma etapa crucial neste processo. Visando mapear os fatores moleculares expressos por *H. seropedicae* SmR1 requeridos para interação com a planta, neste trabalho foi realizada uma análise do perfil transcriptômico durante colonização da rizosfera de milho. Além dos prováveis fatores envolvidos discutidos anteriormente como polissacarídeos bacterianos, foram analisados genes e vias metabólicas diferencialmente expressas, as quais estão envolvidas em sensoriamento ambiental, quimiotaxia, adesão e troca de nutrientes.

A construção e caracterização de uma estirpe deficiente na produção de EPS permitiria determinar sua função durante formação de biofilme, adesão de *H. seropedicae* na superfície radicular, assim como durante a colonização dos tecidos internos da planta. Visando construir uma estirpe de *H. seropedicae* em que apenas o LPS estivesse alterado, foi selecionado o gene *waaL* para mutagênese, uma vez que a O-antígeno ligase codificada seria específica para biossíntese de LPS. Desta forma, a identificação, isolamento e caracterização do gene codificante para antígeno-

O ligase de *H. seropedicae* permitiria determinar a importância deste na biossíntese do LPS, e consequentemente na colonização de gramíneas.

#### 4. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi determinar o papel de fatores moleculares na interação de *H. seropedicae* com milho, incluindo polissacarídeos bacterianos e proteínas de superfície bacteriana e vegetal.

Objetivos específicos:

1. Determinar a função do lipopolissacarídeo (LPS) de *H. seropedicae* na colonização de milho.
2. Determinar as condições de expressão dos genes responsáveis pela biossíntese e transporte do lipopolissacarídeo de *H. seropedicae*.
3. Determinar a função do exopolissacarídeo (EPS) de *H. seropedicae* na colonização de milho.
4. Identificar proteínas da membrana externa de *H. seropedicae* envolvidas na adesão à superfície radicular de milho.
5. Identificar proteínas da raiz de milho envolvidas na adesão de *H. seropedicae*.
6. Analisar o perfil transcriptômico de *H. seropedicae* durante colonização da rizosfera.

## 5. METODOLOGIA

### 5.1. BACTÉRIAS

As estirpes bacterianas utilizadas estão listadas na Tabela 1.

TABELA 1 – CARACTERÍSTICAS DAS ESTIRPES BACTERIANAS.

Estirpe	Características <sup>a</sup>	Referência
<i>Escherichia coli</i> Top10	F- <i>mcrA</i> $\Delta$ ( <i>mcrR</i> - <i>hsdRMS</i> - <i>mcrBC</i> ) $\phi$ 80/ <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 <i>lacX74 deoR recA1 endA1 ara</i> $\Delta$ 139 $\Delta$ ( <i>ara</i> , <i>leu</i> ) 7697 <i>galU galK</i> $\lambda^-$ <i>rpsL nupG</i> $\lambda^-$	INVITROGEN (Carlsbad, CA, EUA)
<i>E. coli</i> S17.1	<i>recA</i> , <i>hsdR</i> RP4-2- <i>Tc::Mu-Km::Tn7</i>	SIMON, PRIEFER & PUHLER, 1983
<i>Herbaspirillum</i> <i>seropedicae</i> SMR1	Variante espontâneo da estirpe tipo Z78 Sm <sup>r</sup> , Nif <sup>+</sup> , isolada de raízes de sorgo	PEDROSA <i>et al.</i> , 1997
<i>H. seropedicae</i> RAM4	<i>H. seropedicae</i> SMR1 expressando Ds-RED, Sm <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup>	MONTEIRO <i>et al.</i> , 2008
<i>H. seropedicae</i> MHS1	<i>H. seropedicae</i> SMR1 <i>epsG::lacZ</i> , Sm <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup>	TADRA-SFEIR <i>et al.</i> , 2011
<i>H. seropedicae</i> LPSEB	<i>H. seropedicae</i> SMR1 <i>waal</i> <sup>-</sup> , Sm <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup>	Este trabalho
<i>H. seropedicae</i> EPSEB	<i>H. seropedicae</i> SMR1 <i>epsB</i> , Sm <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup>	Este trabalho
<i>H. seropedicae</i> pPWpLPSpol	<i>H. seropedicae</i> SMR1 contendo plasmídeo pPWpLPSpol, Sm <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup>	Este trabalho
<i>H. seropedicae</i> pPWpLPSlig	<i>H. seropedicae</i> SMR1 contendo plasmídeo pPWpLPSlig, Sm <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup>	Este trabalho
<i>H. seropedicae</i> $\Delta$ <i>phbC1</i>	<i>H. seropedicae</i> SMR1 $\Delta$ <i>phbC1</i> , Sm <sup>r</sup>	TIRAPELLE <i>et al.</i> , 2013
<i>H. seropedicae</i> IM40	<i>H. seropedicae</i> SMR1 contendo fusão cromossomal <i>nifH::lacZ</i> , Sm <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup>	MACHADO <i>et al.</i> , 1996
<i>H. seropedicae</i> LNamtBlacZ	<i>H. seropedicae</i> SMR1 contendo fusão plasmidial <i>amtB::lacZ</i> , Sm <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup>	NOINDORF <i>et al.</i> , 2006
<i>H. seropedicae</i> pEMS120	<i>H. seropedicae</i> SMR1 contendo fusão plasmidial <i>nifA::lacZ</i> , Sm <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup>	SOUZA <i>et al.</i> , 2000

<i>H. seropedicae</i> pEMS140	<i>H. seropedicae</i> SMR1 contendo fusão plasmidial <i>nifB::lacZ</i> , Sm <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup>	REGO <i>et al.</i> , 2006
<i>Azospirillum brasilense</i> FP2	<i>N</i> -nitroguanidina variante da estirpe tipo Sp7, Nif <sup>+</sup> , isolada de raízes de <i>Digitaria decumbens</i>	PEDROSA <i>et al.</i> , 1997

<sup>a</sup> Sm = estreptomicina; Km = canamicina; Cm = cloranfenicol; Tc = tetraciclina; e o sobrescrito r = resistente.

## 5.2. PLASMÍDEOS

Os plasmídeos utilizados estão listados na Tabela 2.

TABELA 2 – CARACTERÍSTICAS DOS PLASMÍDEOS.

Plasmídeos	Características <sup>a</sup>	Referência/Origem
pTZ57R/T	Ap <sup>r</sup> ; <i>lacZ</i> , vetor linearizado para clonagem direta de productos de PCR	FERMENTAS
pSUP202	Ap <sup>r</sup> ; Tc <sup>r</sup> ; Cm <sup>r</sup> ; mob site	SIMON, PRIEFER & PUHLER, 1983
pUC4-KIXX	Ap <sup>r</sup> ; Km <sup>r</sup> ; cassette Tn5 Km	BARANY, 1985
pTZwaaL	Contém o gene <i>waaL</i> de <i>H. seropedicae</i> SMR1 em pTZ57R/T, Ap <sup>r</sup>	Este trabalho
pTZepsB	Contém o gene <i>epsB</i> de <i>H. seropedicae</i> SMR1 em pTZ57R/T, Ap <sup>r</sup>	Este trabalho
pTZwaaLKM	Contém o gene <i>waaL</i> de <i>H. seropedicae</i> SMR1 interrompido pelo cassette Tn903 em pTZ57R/T, Ap <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup>	Este trabalho
pTZepsBKM	Contém o gene <i>epsB</i> de <i>H. seropedicae</i> SMR1 interrompido pelo cassette Tn903 em pTZ57R/T, Ap <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup>	Este trabalho
pSUPwaaLKM	Contém o gene <i>waaL</i> de <i>H. seropedicae</i> SMR1 interrompido pelo cassette Tn903 em pSUP202, Ap <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup>	Este trabalho
pSUPepsBKM	Contém o gene <i>epsB</i> de <i>H. seropedicae</i> SMR1 interrompido pelo cassette Tn903 em pSUP202, Ap <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup>	Este trabalho
pPW452	Tc <sup>r</sup> , gene <i>lacZ</i> sem promotor	WOODEY <i>et al.</i> , 1996

pLig	Contém a região promotora do gene <i>waaL</i> de <i>H. seropedicae</i> SMR1 fusionada com o gene repórter <i>lacZ</i> em pPW202. Tc <sup>r</sup>	Este trabalho
pTransp	Contém a região promotora a montante do gene <i>rfaL</i> de <i>H. seropedicae</i> SMR1 fusionada com o gene repórter <i>lacZ</i> em pPW202. Tc <sup>r</sup>	Este trabalho

<sup>a</sup> Ap = ampicilina; Cm = cloranfenicol; Km = kanamicina; Tc = tetraciclina; e o sobrescrito r = resistente.

### 5.3. CONDIÇÕES E MEIOS DE CULTIVO

As estirpes de *H. seropedicae* foram cultivadas em meio líquido NFbHPN (ANEXO 1) (KLASSEN *et al.*, 1997), a 30°C, sob agitação a 120 rpm, por 24 horas. Os meios NFbHPN sólido e semi-sólido contém 15g/L e 1,75 g/L de ágar, respectivamente.

O meio utilizado para o cultivo de *E. coli* foi o Luria-Bertani (LB) (ANEXO 2) (SAMBROOK *et al.*, 1989), ou Terrific Broth (TB) (ANEXO 3) (SAMBROOK *et al.*, 1989), sob agitação a 120 rpm, à 37°C. O meio LA, utilizado para o cultivo de *E. coli* em meio sólido, é composto pelo meio LB acrescido de 15 g/L de ágar.

Todos os meios foram autoclavados a 120°C, 1,2 atm, por 20 minutos após a preparação.

#### 5.3.1. Antibióticos

Os antibióticos foram utilizados de acordo com a Tabela 3.

TABELA 3 – ANTIBIÓTICOS UTILIZADOS NOS CULTIVOS

Antibiótico	Concentração final para culturas de <i>E. coli</i>	Concentração final para culturas de <i>H. seropedicae</i>
Ampicilina (Amp)	250 µg/mL	-
Tetraciclina (Tc)	10 µg/mL	10 µg/mL
Kanamicina (Km)	50 µg/mL	500 µg/mL
Cloranfenicol (Cm)	30 µg/mL	150 µg/mL
Estreptomicina (Sm)	20 µg/mL	80 µg/mL

As soluções estoques de antibióticos, exceto tetraciclina, foram preparadas em água destilada autoclavada e esterilizadas por filtração (Millipore HAWP 0,2 µm). A solução estoque de tetraciclina foi preparada em etanol 70%. Todas as soluções de antibióticos foram mantidas a -20°C.

### 5.3.2. Manutenção das estirpes bacterianas

As estirpes de *E. coli* foram estocadas em glicerol 50% a -20°C. As estirpes de *H. seropedicae* foram estocadas em frascos de vidros de 5mL contendo 4mL de meio NFbHPN semi-sólido, a temperatura ambiente, sem agitação e devidamente lacrado com fita de silicone.

Os estoques de *E. coli* foram repicados uma vez ao ano, e os estoques de *H. seropedicae* a cada seis meses.



## 5.4. TÉCNICAS DE MANIPULAÇÃO DE DNA.

### 5.4.1. Purificação de DNA genômico de *Herbaspirillum seropedicae*

A purificação do DNA total de *H. seropedicae* foi realizada segundo Souza (1990). Dez mililitros de cultura de *H. seropedicae* ( $D.O_{600} \cong 1,5$ ) crescida em meio NFbHPN na presença dos antibióticos adequados foram centrifugados a 5000 g por 10 minutos, a 4°C. As células foram lavadas com 500 µL de solução salina (NaCl 0,9m/v) e ressuspensas em 500 µL da mesma solução. A lise celular foi feita com adição da enzima lisozima (100 µg/mL) e incubação a 30°C, durante 1 hora. Para completar a lise das células, foi adicionado o detergente SDS 1% (m/v), e a mistura incubada a temperatura ambiente por 10 minutos. A degradação das proteínas foi realizada adicionando-se pronase (50 µg/mL) seguida de incubação a 37°C por 16 horas. A mistura foi extraída uma vez com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) e duas vezes com clorofórmio-álcool isoamílico (24:1). Após a extração, o DNA foi precipitado com dois volumes de etanol absoluto, lavado com 1 mL de etanol 80%, seco a temperatura ambiente e ressuspenso em 100 µL de água MilliQ autoclavada. O DNA foi quantificado com o kit QBit (INVITROGEN), conforme instruções do fabricante, ou por densitometria em gel de agarose.

### 5.4.2. Purificação de DNA plasmidial

A extração dos plasmídeos das células de *E. coli* Top10 foi realizada segundo o método de lise alcalina (SAMBROOK *et al.*, 1989), com algumas modificações. Brevemente, as células de *E. coli* Top10 contendo o plasmídeo de interesse foram coletadas de 1,5mL de cultura por centrifugação por 45 s a 12.000 x g. As células foram então lavadas em 200 µL de tampão GET (glucose 50 mM, EDTA 1 mM, Tris 25 mM pH 8), e ressuspensas em 150 µL do mesmo tampão. O mesmo volume de solução de lise (SDS 1%, NaOH 0,2 M) foi adicionado e misturado por inversão. Após homogeneização da mistura, a lise foi interrompida pela adição de 150 µL de solução de acetato de sódio 3 M (pH 4,8 ajustado com ácido acético). Essa mistura foi então incubada em gelo por 10min, e o precipitado separado por centrifugação por 10min a 12.000 x g. Ao sobrenadante foi adicionado 150 µL de solução clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) para precipitação de proteínas residuais. Após centrifugação por 5min a 12.000 x g, o DNA plasmidial do sobrenadante coletado foi precipitado com etanol absoluto (3 volumes) ou isopropanol (0,6 volumes), e lavado com 1mL de etanol 70%. Após centrifugação por 5 min a 12.000 x g, o DNA foi seco à vácuo e ressuspenso em 30 µL de água MilliQ. Depois da purificação, os plasmídeos foram analisados por eletroforese (agarose 1% em TBE1X).

#### 5.4.3. Extração de DNA a partir de gel de agarose de baixo ponto de fusão

Bandas de gel LMP 0,8%, contendo fragmentos de DNA de interesse, foram recortadas e submetidas a uma segunda eletroforese em gel LMP (0,8%), para

eliminar contaminações de fragmentos de tamanhos diferentes daqueles de interesse. Após a segunda corrida, o DNA presente nas bandas de LMP foi extraído utilizando o kit “GFX PCR DNA and Gel Band Purification” (GE HealthCare). Depois da extração, o tamanho dos fragmentos foi confirmado por eletroforese (agarose 1% em TBE1X) através de comparação com padrão de tamanho molecular.

#### 5.4.4. Eletroforese de DNA

As amostras de DNA foram diluídas em tampão de amostra Fsuds (Tris-HCl 65 mmol/L pH 8,0, EDTA 1,75 mmol/L, Ficoll ® 10%, SDS 1%, azul de bromofenol 0,025) e aplicadas em gel de agarose (1%) ou agarose LMP (0,7%), em tampão TAE (Tris base 40 mmol/L, ácido acético 40 mmol/L, EDTA 2 mmol/L, pH 8,0) ou TBE (Tris base 40 mmol/L, ácido bórico 40 mmol/L, EDTA 2 mmol/L, pH 8,0), em sistema horizontal da HOEFFER. A voltagem e o tempo de corrida variaram conforme a amostra.

Após a eletroforese, o DNA presente nos géis foi visualizado após tratamento com solução de brometo de etídio (0,5 µg/mL), sob luz ultravioleta 320 nm utilizando o sistema UVP (BioImagin Systems).

#### 5.4.5. Digestão de DNA por enzimas de restrição

A digestão de DNA foi realizada segundo protocolo recomendado pelo fabricante das enzimas de restrição (FERMENTAS ou INVITROGEN). Sistemas de reação de 20 µL foram utilizados para confirmação de tamanho de fragmentos. Sistemas de reação de 100 µL foram utilizados para purificação dos fragmentos gerados. A clivagem foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1% (tampão TBE 1X).

#### 5.4.6. Ligação de fragmentos de DNA aos vetores

O vetor linearizado e o fragmento de DNA de interesse, devidamente clivado com as enzimas de restrição adequadas, foram quantificados através de densitometria em sistema UVP (BioImagin Systems) após eletroforese, usando o padrão de peso molecular 1Kb Ladder (FERMENTAS) como referência. O sistema de reação de ligação continha vetor linearizado e DNA inserto em uma razão molar de aproximadamente 1:5 mol; T4 DNA ligase; e tampão de ligação, perfazendo o volume final de 10 µL. A reação foi incubada a 16°C durante a noite. O produto da reação foi transformado em *E. coli* Top 10.

#### 5.4.7. Amplificação de DNA

A amplificação do gene 16S rRNA, para confirmação da espécie bacteriana utilizada, foi realizada pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), como descrito por Kosher e Wilson (1991). Foram utilizados 10 pmol dos *primers* Y1 e Y3, aproximadamente 10ng de DNA gênomico das estirpes de interesse, 0,2mM dNTPs, 1,5mM MgCl<sub>2</sub> e 1 unidade de *Taq* DNA polimerase em um volume final de reação de 50µL, nos seguintes parâmetros: 1 ciclo de 95°C por 1 min e 30 ciclos com uma etapa de 94°C por 45 s, outra de 60°C por 45 s e outra de 72°C por 1 min e 30 s, e extensão final de 72°C por 10 min.

A amplificação dos genes *waal* e *epsB* para posterior mutagênese foi realizada com 10 pmol dos respectivos *primers* (TABELA 4), aproximadamente 10 ng de DNA gênomico da estirpe selvagen, 0,2 mM dNTPs, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> e 1 unidade de *Taq* DNA polimerase em um volume final de reação de 25 µL, nos seguintes parâmetros: 1 ciclo de 95°C por 1 min e 30 ciclos com uma etapa de 94°C por 45 s, outra de 50 ou 55°C por 45 s e outra de 72°C por 2 min, e extensão final de 72°C por 10 min.

TABELA 4 – PRIMERS UTILIZADOS NESTE TRABALHO

Primer	Sequência	T <sub>m</sub> (°C)	Enzimas para clonagem
Y1	5'-TGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGC-3'	62	-
Y3	5'-CTGACCCCACTTCAGCATTGTTCCAT-3'	62	-
M13F	5'-GTTTTCCCAGTCACGAC-3'	60	-
M13R	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'	60	-

waaLF	5'- CTGATC <u>GGATCC</u> AGCGAGGGAGC-3'	50	BamHI
waaLR	5'- CGCGCAGCATGCCCCACAGG-3'	50	SphI
epsBF	5'- GCTGGAACCGCATATGATCGT-3'	55	NdeI
epsBR	5'- CCAGGTGGATCCGGTCAATAA-3'	55	BamHI
promLPSligF	5'- ATAGCCTGCAGACGACGTTG-3'	50	PstI
promLPSligR	5'- CTCAGAATTCAGGGTGGTGC-3'	50	EcoRI
promLPStraspF	5'- CGAGAATTCGCTGGGGAC -3'	45	EcoRI
promLPStraspR	5'- CACATACTGCAGGAGTTCGG-3'	45	PstI

A amplificação dos promotores dos operons relacionados à síntese do LPS de *H. seropedicae* foi realizada com 10 pmol dos respectivos *primers* (TABELA 4), aproximadamente 10 ng de DNA gênomico da estirpe selvagem, 0,2 mM dNTPs, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> e 1 unidade de *Taq* DNA polimerase em um volume final de reação de 25 µL, nos seguintes parâmetros: 1 ciclo de 95°C por 1 min e 30 ciclos com uma etapa de 94°C por 45 s, outra de 45 ou 50°C por 45 s e outra de 72°C por 2 min, e extensão final de 72°C por 10 min.

#### 5.4.8. Sequenciamento de DNA

Fragmentos de DNA de interesse foram sequenciados utilizando os oligonucleotídeos iniciadores (TABELA 4) M13F / M13R do vetor pUC19, ou Y1 / Y3, pelo método de terminação de cadeia utilizando dideoxinucleotídeos marcados com fluoróforos (SANGER, NICKLEN & COULSON, 1977). As reações de sequenciamento

continham 200-400 ng de DNA plasmidial, 3 µL de pré-mix (ET *terminator*), 5 pmol de oligonucleotídeos iniciadores e água MilliQ para completar o volume para 7,5 µL. Como parâmetros da reação de sequenciamento foram utilizados 1 ciclo de 95°C por 1 min, 35 ciclos com uma etapa de 94°C por 20 seg e outra de 60°C por 1min e 30 seg.

Os amplicons foram purificados por precipitação com acetato de amônio 200 mM e dois volumes de etanol absoluto e centrifugação, em seguida lavados com 150 µL de etanol 70% e secos a vácuo. O sequenciamento de bases foi realizado no sequenciador automático de DNA ABI PRISM 377 (Amersham Bioscience).

## 5.5. TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA POR ELETROPORAÇÃO

### 5.5.1. Preparo de células eletrocompetentes

As células de *E. coli* foram crescidas em meio SOB (SAMBROOK *et al.*, 1989) até a cultura atingir DO<sub>600nm</sub> 0,7, e incubadas em gelo por 30 min. As células foram coletadas por centrifugação a 3.000 x g por 5 min e lavadas 2 vezes com água destilada estéril a 4°C e uma vez com solução de glicerol 15% estéril a 4°C. Após estas lavagens, as células foram ressuspensas em glicerol 15% e estocadas a -70°C.

As células eletrocompetentes de *H. seropedicae* foram preparadas através de um processo similar, porém as células foram crescidas em meio NFbN com 5 mM de solução de fosfatos, e as centrifugações foram realizadas por 8 min a 4.000 x g.

### 5.5.2. Transformação bacteriana

O método utilizado para transformação bacteriana foi o descrito pelo fabricante do Cell Porator (Life Technologies). O DNA plasmidial (5 ng) foi adicionado a 100 $\mu$ L da suspensão de células eletrocompetentes, e incubado em gelo por 1 minuto. Em seguida, a mistura de células e DNA foi transferida para uma cubeta de eletroporação e submetidas a um pulso de campo elétrico (4K $\Omega$ , 330 $\mu$ F para *E. coli* e 2,8K $\Omega$ , 330 $\mu$ F para *H. seropedicae*) para permitir a entrada do plasmídeo na célula. Após a eletroporação, as células foram ressuspensas em 1mL do meio de cultura correspondente (SOC para *E. coli* e NFbHPN para *H. seropedicae*) e incubadas sob agitação por 1 hora, na temperatura adequada (37°C para *E. coli* e 30°C para *H. seropedicae*). Em seguida, alíquotas da suspensão foram plaqueadas em meio sólido correspondente contendo o antibiótico adequado à seleção dos transformantes de interesse.

### 5.6. CONJUGAÇÃO BACTERIANA

A estirpe de *E. coli* S17.1 doadora e a estirpe receptora foram cultivadas em meio próprio por 16 horas, sob temperatura adequada e agitação constante. As estirpes foram re-inoculadas numa proporção 1/50 (receptora) e 1/100 (doadora) e



cultivadas em meio sem antibiótico, sendo que a receptora por 6 horas e a doadora por 3 horas, sob agitação constante e temperatura adequada.

Cinco microlitros da estirpe doadora foram misturados com 50  $\mu$ L da estirpe receptora. Esta mistura foi depositada em forma de gota em meio NFbHPN acrescido de meio LA na proporção de 3 para 1. As placas foram incubadas a 30°C por aproximadamente 16 horas. A massa de células foi raspada e ressuspensa em 1mL de meio NFbHPN líquido e, então, 100  $\mu$ L desta suspensão foram plaqueados em NFbHPN sólido na presença dos antibióticos específicos para a seleção dos transconjugantes. As placas foram incubadas a 30°C até a visualização das colônias dos transconjugantes.

#### 5.7. ESTUDO *in silico* DOS GENES RESPONSÁVEIS PELA SÍNTESE DE LPS E EPS DE *H. seropedicae*

A partir de uma busca no genoma de *H. seropedicae* SMR1 (CP002039) utilizando o programa PSI-Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), foram encontradas ORFs com elevada similaridade aos genes responsáveis pela biossíntese de LPS e EPS de outras bactérias. Uma vez identificados os genes, a região genômica e operon em que se encontram foram caracterizados *in silico*, através de comparações da organização, estrutura e similaridade com outros microrganismos, utilizando o programa STRING 8.0 (SNEL *et al.*, 2000), pFAM (FINN *et al.*, 2010) e

busca de promotores utilizando o programa BROM (<http://www.softberry.com>), todos em modo *default*.

A partir da sequência genômica foram desenhados *primers* para amplificação dos genes de interesse (TABELA 4) e posterior mutagênese.

#### 5.8. OBTENÇÃO DAS ESTIRPES MUTANTES DE *H. seropedicae*

Os genes *waaL* e *epsB* de *H. seropedicae* foram amplificados a partir do DNA genômico da estirpe selvagem SMR1 e diretamente clonados em vetor pTZ57R/T, conforme recomendação do fabricante (Fermentas). O cassete de resistência à canamicina (Tn903) foi isolado do vetor pKIXX por restrição com a enzima *Sma*I, eletroforese em agarose e purificação da banda correspondente (1200bp). O cassete Tn903 foi então inserido nos genes clonados, e os genes interrompidos foram transferidos para o vetor pSUP202. As construções foram então transformadas em *E. coli* S17.1, e os transformantes conjugados com a estirpe selvagem *H. seropedicae* SMR1. Os mutantes que sofreram recombinação homóloga dupla foram obtidos por seleção negativa, e nomeados *H. seropedicae* LPSEB (*waaL*<sup>-</sup>) e EPSEB (*epsB*<sup>-</sup>). A espécie de todos os microrganismos foi confirmada por amplificação e sequenciamento do gene 16S rRNA. A inserção do cassete no genoma foi confirmada por PCR.

#### 5.9. PREPARAÇÃO DO LPS DAS ESTIRPES DE *H. seropedicae* PARA ANÁLISE POR SDS-PAGE

A extração do LPS total para análise eletroforética foi realizada segundo Broughton e colaboradores (2006), com algumas modificações. As células bacterianas obtidas pela centrifugação de 1mL de culturas das estirpes de *H. seropedicae* ( $DO_{600} = 1.0$ ) foram lisadas em 80  $\mu$ l de tampão de lise [1M Tris pH6,8; 4%  $\beta$ -mercaptoetanol; 10% glicerol; 0,005% bromofenol azul] à 100°C por 10 min. Depois de resfriado a temperatura ambiente, foram adicionados ao sistema 2% de SDS (m/v) e 0.08 mg.mL<sup>-1</sup> de proteinase K, misturados e incubados à 60°C por 16 horas. Após incubação, 2 volumes de tampão de amostra [120mM Tris pH6,8; 3% SDS; 9%  $\beta$ -mercaptoetanol; 30% glicerol; 0,03% bromofenol azul] foram adicionados, e 5 $\mu$ l da mistura final foram aplicados em um gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 16% m/v), submetido a um campo elétrico de 100 V por 2 h e 30 min, e finalmente visualizado por oxidação com periodato e coloração com prata (TSAI e FRISCH, 1982).

#### 5.10. PREPARAÇÃO DO EPS DAS ESTIRPES DE *H. seropedicae* PARA ANÁLISE POR SDS-PAGE

As estirpes selvagem e mutante *epsB* de *H. seropedicae* foram crescidas em 10 mL de meio NFbHPN, 30°C, 120 rpm na presença de 50 mg de fibras de vidro. Após 24 horas, as culturas de bactérias juntamente com a fibra de vidro foram

transferidas para tubos tipo Falcon, e vortexadas vigorosamente para remoção das bactérias aderidas à fibra. As células e as fibras de vidro foram então removidas por centrifugação (15 min, 3000 g), e o sobrenadante foi filtrado em membrana de 0,22 µm para remoção de células residuais. Polissacarídeos presentes no sobrenadante filtrado foram precipitados com 3 volumes de etanol absoluto, por 24 horas a -20°C, seguido de centrifugação (30 min, 4°C, 3000 g). O precipitado foi seco à vácuo e ressuspenso em água MilliQ.

A concentração de açúcar total foi determinada pelo método de fenol/ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956). Para análise eletroforética, 2 volumes de tampão de amostra [120mM Tris pH6,8; 3% SDS; 9% β-mercaptoetanol; 30% glicerol; 0,03% bromofenol azul] foram adicionados, e 10µl da mistura final foram aplicados em um gel (SDS-PAGE) com gradiente de acrilamida de 10 - 16% (m/v), submetido a um campo elétrico de 100 V por 1 h e 30 min, e finalmente visualizada por oxidação com periodato e coloração com prata (TSAI e FRISCH, 1982).

## 5.11. ENSAIOS *in planta*

### 5.11.1. Desinfecção da superfície das sementes

As sementes de *Zea mays* cv. F3053 (Pioneer) foram esterilizadas em etanol 70% (v/v) por 5 minutos e, em seguida, com uma solução de hipoclorito de sódio 1%

(v/v) e Tween20 0,01% (v/v) por 20 minutos. As sementes foram então lavadas quatro vezes com água destilada estéril.

#### 5.11.2. Cultivo de plantas em sistema hidropônico e inoculação com as estirpes de *H. seropedicae*

Após esterilização as sementes foram transferidas para placas contendo ágar – água (0,7%). As placas foram envoltas em papel alumínio e mantidas a 28°C por três dias para germinação. Cada plântula foi inoculada por imersão em suspensão de bactérias na concentração de  $10^5$  células das estirpes de *H. seropedicae*, por 30 min a 30°C. As plântulas inoculadas foram então transferidas para tubos de ensaio (30 cm) contendo 30 mL de meio para gramíneas (EGENER *et al.*, 1999 sem fonte de carbono) e 10 g de esferas de polipropileno, e crescidas a 28°C com período de luz de 12h e 1250 lux (Fig. 4).

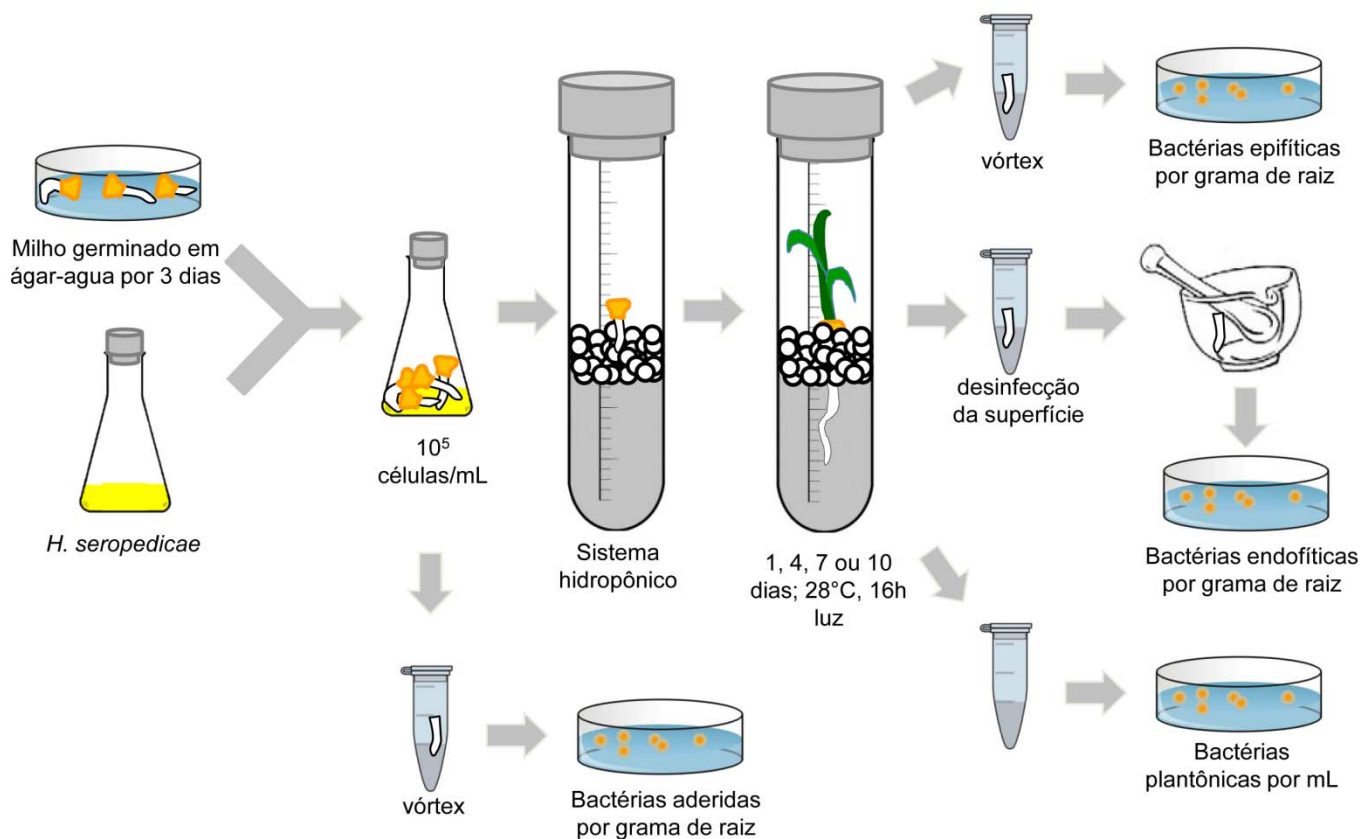


FIGURA 4 – ESQUEMA DOS ENSAIOS DE AVALIAÇÃO DA COLONIZAÇÃO DE MILHO POR *H. seropedicae*.

#### 5.11.3. Ensaios de adesão das estirpes de *H. seropedicae* às raízes de milho

Imediatamente após a inoculação, as amostras de raiz (aproximadamente 0,05 g de raiz, peso fresco) foram cortadas, pesadas e lavadas duas vezes por imersão em solução salina estéril (NaCl 0,9%), e então agitadas em vórtex vigorosamente por 20 segundos em 1 mL da mesma solução (Fig. 4). O sobrenadante foi utilizado para determinar o número de bactérias aderidas por grama de raiz de milho úmida através de diluição seriada e contagem em meio sólido.

Ensaio de competição para adesão foram realizados usando como inoculante as estirpes selvagem e mutantes na proporção de 1:1, com um total de  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$  ou  $10^5$  bactérias por plântula. A contagem foi determinada como descrito acima, e as estirpes foram identificadas pela resistência a antibiótico.

Para investigar se proteínas de membrana externa também estão envolvidas na adesão, as células de *H. seropedicae* SmR1 foram tratadas com uma concentração não letal de proteinase-K ( $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$  por 20 minutos a  $30^\circ\text{C}$ ) e  $10^5$  células tratadas foram inoculadas por plântula de milho. O tratamento com proteinase-K não afetou a sobrevivência de *H. seropedicae*. Para avaliar se proteínas de superfície radicular são necessárias para a adesão bacteriana, as raízes de milho foram tratadas com  $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de proteinase-K por 20 minutos a  $30^\circ\text{C}$  e então inoculadas com  $10^5$  células de *H. seropedicae*.

Ensaio de inibição da adesão foram realizados pela adição de  $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$  de aglutinina de gérmen de trigo (WGA), ou lectina purificada de raiz de milho, ou LPS purificado, ou  $0,5 \text{ mM}$  de N-acetil glucosamina em  $10^5$  células de *H. seropedicae* imediatamente antes da inoculação na planta. Foi realizada uma curva de concentração de WGA ( $0 - 0,1 - 0,5$  e  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) para adição no ensaio, e  $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$  apresentou os resultados mais reprodutíveis.

Ensaio de competição pela adesão entre *H. seropedicae* e *A. brasilense* foram realizados usando como inoculante uma mistura de *H. seropedicae* RAM4 e *A. brasilense* FP2 na proporção de 1:1, com um total de  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$  ou  $10^5$  bactérias por plântula, na ausência e na presença de  $0,5 \text{ mM}$  de N-acetil glucosamina. A

contagem foi determinada como descrito acima, e as estirpes foram identificadas pela resistência a antibiótico e morfologia de colônia.

#### 5.11.4. Ensaios de colonização endofítica das raízes de milho pelas estirpes de

*H. seropedicae*

A determinação do número de bactérias endofíticas foi realizada 1, 4, 7 e 10 dias após inoculação. As raízes tiveram sua superfície desinfetada por uma lavagem de 2 minutos em etanol 70% (v/v), seguido de 2 minutos em hipoclorito de sódio 1% (v/v), e então lavadas duas vezes com água destilada estéril por 2 minutos. As raízes foram cortadas, pesadas, e então maceradas em grau estéril em 1 mL de solução salina (NaCl 0,9%). Os extratos foram utilizados para determinar o número de bactérias endofíticas colonizando os tecidos radiculares internos de milho, através de diluição seriada e contagem em meio sólido (Fig. 4).

#### 5.11.5. Ensaios de colonização epifítica das raízes de milho pelas estirpes de *H.*

*seropedicae*

A determinação do número de bactérias epifíticas de raiz foi realizada 1, 4, 7 e 10 dias após inoculação. As amostras de raiz foram cortadas, pesadas e lavadas duas vezes por imersão em solução salina estéril (NaCl 0,9%), e então vortexadas vigorosamente por 20 segundos em 1 mL da mesma solução (Fig. 4). O sobrenadante



foi utilizado para determinar o número de bactérias epifíticas por grama de raiz de milho (peso fresco) através de diluição seriada e contagem em meio sólido.

#### 5.12. FORMAÇÃO DE BIOFILME EM FIBRA DE VIDRO

As estirpes de *H. seropedicae* foram cultivadas em 10 mL de meio NFbHPN com adição de 50 mg de fibra de vidro, a 30°C e 120rpm. Amostras da fibra de vidro foram coletadas em doze e dezesseis horas após inoculação. As fibras de vidro foram coradas com 200 µL de violeta cristal 1% (m/v), e lavadas três vezes com solução salina 0,9% (m/v). Então, 1 mL de etanol absoluto foi adicionado para remover o corante, e esta solução foi utilizada para determinar a absorbância em 550 nm. O controle negativo deste procedimento foi realizado sem inoculação bacteriana. Os dados foram expressos como DO<sub>550</sub> das amostras subtraída da DO<sub>550</sub> do controle negativo. Amostras da fibra de vidro corada após crescimento bacteriano foram preparadas para análise por microscopia óptica.

#### 5.13. REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES DE BIOSÍNTESE DE LPS E EPS EM *H. seropedicae*

##### 5.13.1. Determinação da atividade específica de β-galactosidase

Para avaliar o efeito da adição de íons cálcio sobre a expressão gênica, as estirpes contendo as fusões plasmidiais foram incubadas a 30°C, 120rpm, por 16h em meio NFbHPN sem cálcio. As estirpes foram re-inoculadas nas mesmas condições por três vezes. Em seguida, as células do terceiro cultivo foram lavadas com solução salina estéril (NaCl 0,9%) e ressuspensas (DO<sub>600</sub> 0,2) em meio NFbHPN sem cálcio, NFbHPN sem cálcio contendo EGTA (0,1 mM) ou NFbHPN contendo 5 mM de CaCl<sub>2</sub>. Esta concentração de cálcio mostrou-se eficiente na indução da expressão do gene *rfbB* de *H. seropedicae* (BALSANELLI *et al.*, 2010). Estas células foram incubadas por 6 horas (até DO<sub>600</sub> 1,0), e então a atividade de β-galactosidade foi determinada segundo Miller (1972). Alíquotas de 100 µL da cultura de bactérias foram lisadas com 50 µL de clorofórmio, e em seguida adicionado 900 µL de tampão Z (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 60 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 40 mM, KCl 10 mM, MgSO<sub>4</sub> 1mM, β-mercaptoetanol 50 mM, SDS 0,1%). A mistura foi incubada a 30°C por 10 min, e então foi adicionado 200 µL de o-nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo (ONPG, 4 mg.mL<sup>-1</sup> em tampão Z). Após período adequado, a reação foi interrompida com 400 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1 M), centrifugada por 15 min a 12.000 x g e determinada a absorbância em 415 nm (o-nitrofenol) e 550 nm (turbidez da mistura). A atividade específica foi calculada como a DO<sub>415</sub> - DO<sub>550</sub> e normalizada pelo produto do tempo de reação, volume de cultura e concentração total de proteínas na amostra. A concentração de proteínas foi determinada segundo Bradford (1976), utilizando albumina de soro bovino como padrão.

Para avaliar o efeito da interação direta com plantas de milho sobre a expressão dos genes de biossíntese de LPS ou EPS, as estirpes contendo as fusões

foram incubadas a 30°C, 120rpm, por 16h em meio NFbHPN. Em seguida, as células foram lavadas com solução salina estéril (NaCl 0,9%) e ressuspensas (DO<sub>600</sub> 1,0) em meio para gramíneas. Estas células foram inoculadas no sistema hidropônico descrito no item 3.11.2. e incubadas 24 horas. A atividade de β-galactosidade foi determinada segundo Miller (1972), utilizando as células recuperadas do meio para gramíneas por centrifugação, e as células aderidas às esferas de polipropileno ou à raiz do milho recuperadas por vórtex seguido de centrifugação.

Para avaliar o efeito da formação de biofilme sobre a expressão dos genes de biossíntese de EPS, a estirpe MHS01 de *H. seropedicae* foi cultivada conforme descrito no item 3.12. por 12 ou 24 horas. A atividade de β-galactosidade foi determinada segundo Miller (1972), utilizando as células recuperadas do meio líquido, e as células aderidas à lã de vidro recuperadas por vórtex seguido de centrifugação.

#### 5.14. ANÁLISE DO PERFIL TRANSCRIPTÔMICO DE *H. seropedicae* DURANTE COLONIZAÇÃO DA RIZOSFERA.

##### 5.14.1. Extração de RNA

As amostras bacterianas foram coletadas 1 e 3 dias após inoculação nas plantas. Bactérias em estado plantônico foram coletadas a partir de 1 L de meio hidropônico por centrifugação (10.000 g, 8 min, 4°C) e resuspensas em tampão de lise gelado (Tris 50 mM pH 8.0, EDTA 10 mM, SDS 0.6%). Bactérias aderidas foram

removidas das raízes de aproximadamente 600 plântulas por vórtex em tampão salino durante 1 minuto, isoladas por centrifugação (10,000 g, 8 min, 4°C) e suspensas em tampão de lise gelado. Para ambas as amostras, o RNA total foi purificado por extração com TRI® Reagent (Sigma) – clorofórmio. As amostras foram tratadas com DNaseI (Ambion) e o RNA foi quantificado com NanoDrop (THERMO Scientifics) e por eletroforese (agarose 1%, TBE 1X). O RNA ribossomal foi parcialmente depletado utilizando duas vezes o kit Microbe Express (Ambion), de acordo com as instruções do fabricante.

#### 5.14.2. Construção das bibliotecas e sequenciamento em larga escala com SOLiD

As bibliotecas de cDNA foram construídas com 0,5 µg de RNA depletado usando o kit SOLiD™ Whole Transcriptome Analysis (Applied Biosystems) e foram marcadas com sequências identificadoras com o kit SOLiD™ Transcriptome Multiplexing (Applied Biosystems). SOLiD™ ePCR e SOLiD™ EZBead Enrichment (ambos da Applied Biosystems) foram utilizados para processamento das amostras para sequenciamento, e o protocolo SOLiD™ 4Plus (Applied Biosystems) foi utilizado para o sequenciamento.

#### 5.14.3. Análise das sequências de cDNA produzidas

As sequências produzidas foram selecionadas por qualidade, mapeadas no genoma de referência e analisadas utilizando o programa CLC Genomics Workbench (CLC Bio). Um gene foi considerado expresso quando mostrou cobertura de leituras igual ou maior de 3 vezes, e diferencialmente expresso quando o valor de RPKM foi 2 vezes maior/menor que na condição comparativa, com valor de p menor que 0,05 (teste de Baggerley). Mapas de calor foram produzidos em Microsoft Excel 2007.

#### 5.14.4. Validação das sequências diferencialmente expressas

Para validação com RT-PCR, os cDNAs foram sintetizados usando o kit High-capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems), e quantificados usando Power SYBR-Green PCR Master Mix em termociclador Step One Plus Real Time-PCR System (Applied Biosystems). O programa Primer express 3.0 foi utilizado para o desenho dos oligonucleotídeos iniciadores. O gene 16S rRNA foi utilizado como controle interno, e a expressão gênica relativa foi determinada usando o método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak and Schmittgen, 2001). Para validação com ensaios de  $\beta$ -galactosidase, o ensaio em planta foi realizado utilizando como inoculante as estirpes repórter *H. seropedicae* IM40 (*nifH::lacZ*), L<sub>Namt</sub>BlacZ (*amtB::lacZ*), pEMS120 (*nifA::lacZ*) e pEMS140 (*nifB::lacZ*). As bactérias foram isoladas como descrito anteriormente, e a atividade específica de  $\beta$ -galactosidase foi determinada como descrito no item 5.13.1.

## 5.15. IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DA MEMBRANA EXTERNA DE *H. seropedicae*

### 5.15.1. Purificação de proteínas da membrana externa de *H. seropedicae*

A estirpe selvagem SMR1 de *H. seropedicae* foi cultivada em 50 mL de meio NFbHPN até D.O.<sub>600</sub> aproximadamente 1,0. As células foram coletadas por centrifugação (5.000 rpm, 8 minutos), ressuspensas em 800 µL de tampão SP (NaCl 8.5 g/L; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7 g/L; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3 g/L; pH 7.2) e sonicadas com 15 pulsos de 15 seg com 15 seg de intervalo. O extrato celular foi centrifugado (13.000 rpm, 10 minutos, 4°C). A solução sobrenadante foi retirada com cuidado e submetida a ultracentrifugação (144.000 g, 1 hora e 30 minutos, 4°C) em ultracentrifuga Hitachi Himac CP90B (rotor P50A2). O precipitado foi lavado com 1 mL de tampão SP e ultracentrifugado novamente nas mesmas condições. O precipitado foi então dissolvido em 1 mL tampão SP para purificação. Proteínas de membrana externa foram isoladas do extrato de envelope celular por tratamento com 0,5% de Sarkosyl NL97 por 30 min a 28°C, seguido de centrifugação a 100.000 g por 60 min (BACHHAWAT & GHOSH, 1987). O precipitado contendo proteínas de membrana externa foi lavado com tampão SP, coletado por ultracentrifugação nas mesmas condições, ressuspenso em tampão SP e armazenado a -20°C.

### 5.15.2. Separação de proteínas de membrana externa por SDS-PAGE

A separação das proteínas purificadas foi realizada por eletroforese SDS-PAGE em gradiente de acrilamida de 7 – 16% (m/v) em sistema Ruby (GE HEALTHCARE), a 100V por 6 horas. As bandas proteicas foram coradas com Coomassie G250, e após fotodocumentação foram recortadas do gel e tratadas para análise por espectroscopia de massa.

#### 5.15.3. Identificação das proteínas da membrana externa de *H. seropedicae* por espectroscopia de massa (MALDI-TOF)

A preparação das amostras para análise foi realizada de acordo com Shevchenko et al. (1996), com algumas modificações. As bandas proteicas foram cortadas do gel e divididas em pedaços de cerca de 1 mm<sup>2</sup>. Os pedaços de gel foram descorados em solução de acetonitrila 50%/bicarbonato de amônio 25 mM pH 8,0, com duas lavagens de 400 µL por 30 minutos. Em seguida o gel foi desidratado com 200 µL de acetonitrila por 5 min e seco completamente a temperatura ambiente em fluxo laminar. O gel foi reidratado com solução de tripsina 15 ng/µL em bicarbonato de amônio 40 mM / 10% acetonitrila em gelo por 30 minutos. A digestão foi realizada por 16 horas a 30°C. Um microlitro do sobrenadante foi misturado com 1 µL de matriz HCCA (10 mg.mL<sup>-1</sup> em acetonitrila 50%, TFA 0,1%), e colocado na placa de amostras do MALDI-TOF. O espectros de massa foram obtidos usando o espectrômetro MALDI-ToF-MS Autoflex (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) no modo positivo, 20 kV de

voltagem de aceleração, janela de aquisição de 800 – 3200 Da. A calibração externa foi realizada com kit de calibração de peptídeos do fabricante, e a lista de íons foi criada usando o programa FlexAnalysis 2.0 (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). A lista de picos foi utilizada para busca PMF contra o banco de dados do genoma de *H. seropedicae*, utilizando o programa MASCOT (MATRIX SCIENCE).

## 5.16. IDENTIFICAÇÃO DE RECEPTORES VEGETAIS ENVOLVIDOS NA ADESÃO BACTERIANA

Balsanelli e colaboradores (2010) observaram que a adesão de *H. seropedicae* à superfície radicular de milho é inibida pela presença de GlcNAc, sugerindo que este monossacarídeo compete com o LPS da bactéria pela ligação à receptores vegetais. Para isolamento destes receptores envolvidos na interação com *H. seropedicae*, foi realizada cromatografia de afinidade das proteínas de raiz de milho em fase sólida de GlcNAc.

### 5.16.1. Extração de proteínas totais de raiz de milho

Dez gramas de raízes frescas cortadas de plântulas de 3 dias de idade foram congeladas com nitrogênio líquido e maceradas em 10mL de tampão de extração (10 mM Tris, pH 7.2, 150 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, 20 µg/mL DNase, 0.001% inibidor de protease PMSF) em gelo. Após solubilização, o extrato foi sonificado (5 pulsos de



15 seg, 45 seg de intervalo), partículas residuais e material insolúvel foram removidos por centrifugação a 10.000 g, 30 min, 4°C.

#### 5.16.2. Cromatografia de afinidade

A coluna de GlcNAc – agarose (SIGMA) foi equilibrada com tampão de lavagem (20 mM Tris, 0,15 M NaCl, 0.5% Triton X-100, pH 7,5), e em seguida o extrato de proteína total de raiz foi aplicado (taxa de vazão 2 mL.h<sup>-1</sup>). Proteínas não ligadas foram lavadas com 10 mL de tampão de lavagem. Proteínas ligantes de NAc-Glc foram eluídas com o tampão de lavagem acrescido de 0,5 M de GlcNAc (taxa de vazão de 2 mL/h), dializadas contra tampão de lavagem e concentradas por precipitação com TCA 10% (v/v). Amostras das frações foram analisadas por SDS-PAGE 12%. Proteínas purificadas foram identificadas por espectroscopia de massa segundo item 5.15.3.

#### 5.17. ENSAIOS DE AGLUTINAÇÃO

As estirpes selvagem e mutante LPSEB de *H. seropedicae* foram crescidas em meio NFbHPN até D.O.<sub>600</sub>=1,0. Para ensaios quantitativos, 200 µL da cultura bacteriana foram incubados com concentrações crescentes (0-1 mg.mL<sup>-1</sup>) de WGA (Sigma) sem agitação por 60 minutos a 30°C. A aglutinação foi calculada dividindo a D.O.<sub>600</sub> das bactérias que continuaram em suspensão pela D.O.<sub>600</sub> das bactérias não

tratadas e expressa em percentagem. Os ensaios de aglutinação também foram realizados na presença de 2% de N-acetil glucosamina ou 2% de LPS purificado. Controles negativos foram realizados com concentrações crescentes de BSA (Sigma) ou 2% de glucose. Para ensaios qualitativos, 20  $\mu$ L da cultura bacteriana foram colocados em lâminas de vidro, misturados com 0,5 mg.mL<sup>-1</sup> de BSA, WGA, lectinas de milho purificadas tanto na ausência como na presença de N-acetil glucosamina (2%) e analisados por microscopia ótica.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1. ANÁLISES *in silico* DA VIA DE BIOSSÍNTESE DE LPS EM *H. seropedicae*

A análise do genoma de *H. seropedicae* por comparação direta com organismos com vias biossintéticas de LPS descritas mostrou a presença de diversos genes codificantes para proteínas envolvidas na biossíntese desta molécula (ANEXO 4). Na maior parte das bactérias os genes de vias de biossíntese de LPS compreendem um agrupamento gênico contendo genes de biossíntese de monossacarídeos, glicosiltransferases, sistemas de transporte de açúcares tipo ABC, antígeno-O polimerase, antígeno-O flipase e outros genes relacionados (REEVES & WANG, 2006). Em *H. seropedicae*, estes genes encontram-se dispersos no genoma, formando pequenos operons (Fig. 5), como em *G. diazotrophicus* (BERTALAN *et al.*, 2009).

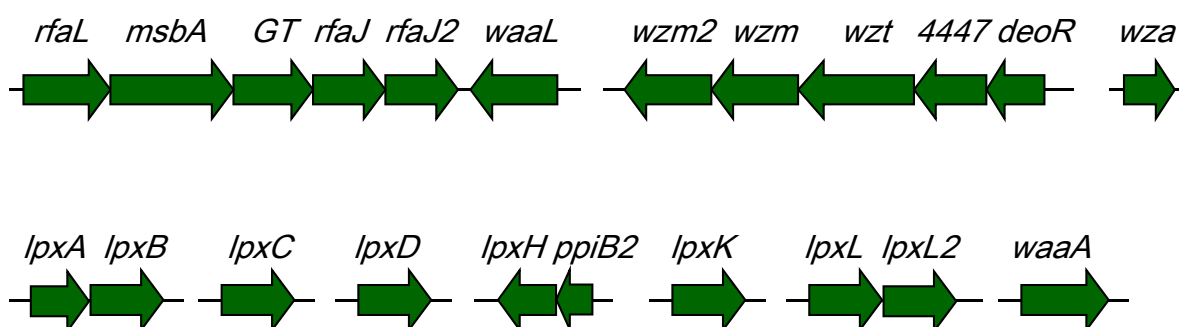


FIGURA 5 - ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DOS GENES RESPONSÁVEIS PELA BIOSSÍNTESE DE LPS EM *H. seropedicae*. *rfaL* codifica para lipídeoA-oligossacarídeo central ligase; *msbA* para lipídeoA flipase; *GT*, *rfaJ*, *rfaJ2* para glicosiltransferases; *waaL* para antígeno-O ligase; *wzm* e *wzm2* para

permease do transportador ABC; *wzt* para ATPase do transportador ABC; *Hsero\_4447* para componente periplasmático do transportador ABC; *deoR* para regulador transcricional; *wza* para exportador de polissacarídeo de membrana externa; *lpxA* para aciltransferase, *lpxB* para lipídeo-a-dissacarídeo sintase; *lpxC* para GlcNAc deacetilase; *lpxD* para glucosamina N-aciltransferase; *lpxH* para diacilglucosamina hidrolase; *ppiBe* para chaperona; *lpxK* para tetracildissacarídeo 4'-quinase; *lpxL* e *lpxL2* para laurilaciltransferase; e *waaA* para KDO transferase. Escala 1 cm = 1 Kb.

De acordo com o conteúdo gênico e as estruturas químicas elucidadas por Serrato e colaboradores (2012), e baseado no modelo de *E. coli*, pôde-se sugerir a via de biossíntese da estrutura básica da porção lipídeo-A de *H. seropedicae* (Fig. 6).

A biossíntese do lipídeo-A é iniciada pela ligação éster consecutiva de ácidos graxos na UDP-N-acetil glucosamina por LpxA, seguida pela desacetilação do grupo amina por LpxC. *H. seropedicae* pode conter cinco diferentes ácidos graxos como constituintes do LPS: 3OH-C<sub>12:0</sub> (54,6 mol% dos ácidos graxos do LPS), C<sub>16:0</sub> (29,4 mol%), 3OH-C<sub>10:0</sub> (11,0 mol%), C<sub>12:0</sub> (2,9 mol%), e C<sub>14:0</sub> (2,0 mol%). Entretanto, apenas a posição de dois 3OH-C<sub>12:0</sub> N-substituídos em ambos GlcN ligadas β(1-6) foi determinada, provavelmente pela ação de LpxD. Após remoção do grupo UMP por LpxH, a molécula formada, denominada lipídeo-X, é condensada com seu próprio precursor UDP-2,3-diacil-glucosamina por LpxB, formando a estrutura básica do lipídeo-A, que é então fosforilado no O-4' por LpxH. LpxL e LpxM inserem os ácidos graxos restantes nos grupos hidroxilas livres da GlcN e dos ácidos graxos ramificados. Em um passo seguinte, a enzima ArnT liga uma 4-N-arabinose em ambos grupos fosfato 1- e 4'- do lipídeo-A. Neste passo, Ara4N é carregada por um grupo

undecaprenil fosfato. A biossíntese de Ara4N começa com a decarboxilação oxidativa de UDP-ácido glucurônico, promovida por ArnA, resultando em UDP-4-cetopentose, seguido de transaminação usando glutamato como substrato de ArnB para formar UDP-L-Ara4N. Duas unidades de Kdo são O-ligadas ao C6' da GlcN-lipídeo-A por WaaA, formando a primeira parte do oligossacarídeo central. Este lipídeo-A maduro é então translocado para a face externa da membrana interna pela lipídeo-A flipase MsbA (RAETZ, 1990; SERRATO *et al.*, 2012).

A via de biossíntese do oligossacarídeo central do LPS provavelmente envolve a adição de açúcares ao lipídeo-A por glucosiltransferases como as proteínas Rfa e Waa. Como estas enzimas são preditas como ancoradas na face citosólica da membrana interna, a adição do oligossacarídeo central deve ocorrer antes da translocação da molécula por MsbA (VALVANO, 2011).

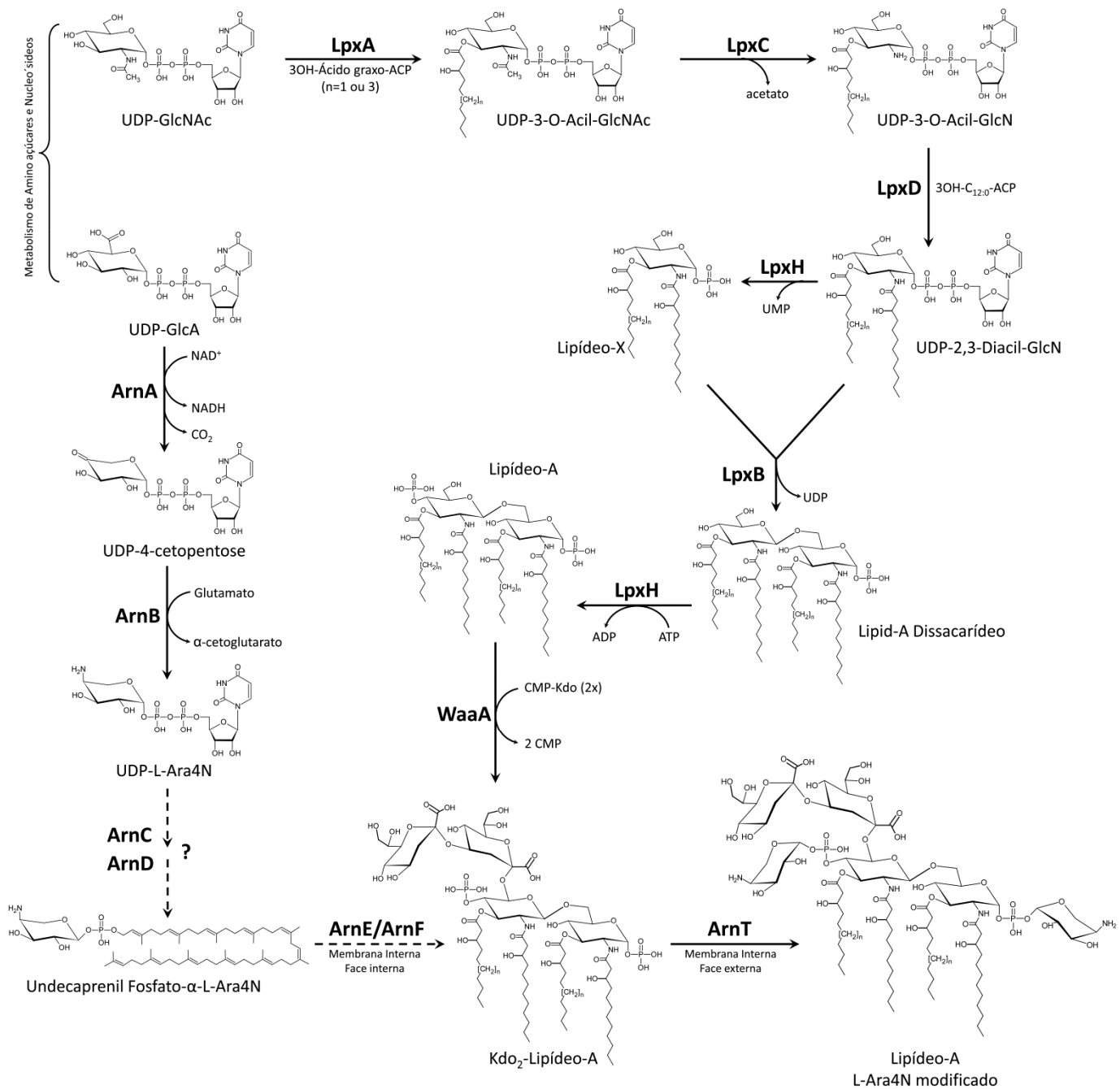


FIGURA 6 – VIA DE BIOSÍNTESE E MODELO ESTRUTURAL DA PORÇÃO LIPÍDEO-A DO LPS DE *H. seropedicae*. Com base no conteúdo gênico de *H. seropedicae* (ANEXO 4) foi gerada a provável via de biossíntese do lipídeo-A. Os modelos estruturais foram gerados por homologia com demais gram negativas e nas estruturas elucidadas por SERRATO *et al.* (2012). Todos os genes codificantes para as proteínas incluídas no modelo estrutural foram encontradas no genoma de *H. seropedicae* (ANEXO 4).

Em uma via separada, a reação inicial de biossíntese de antígeno-O é a ligação fosfoanhidrina entre um nucleosídeo difosfo N-acetilaminoaçúcar ao carreador acil undecaprinil-PP por WecA. Esta molécula funciona como base para a translocação de UDP-açúcares por glicosiltransferases até a formação da unidade polimérica. *H. seropedicae* possui 23 glicosiltransferases anotadas que poderiam ser as responsáveis por estas transferências, e contém cinco diferentes monossacarídeos como constituintes do LPS: ramnose (35,9 mol%), N-acetil glucosamina (28,2 mol%), glucose (27,5 mol%), ácido 3-deoxi-mano-oct-2-ulopiranosônico (6,2 mol%), e 4-N-arabinose (2,1 mol%) (BALSANELLI *et al.*, 2010). Existem quatro sistemas descritos como responsáveis pela exportação e montagem final do antígeno-O: Wzy/Wzx-, Wzm/Wzt-, sintase-, e Wzk-dependente (revisado por CUTHBERTSON, KOS e WHITFIELD, 2010; e VALVANO, 2011). O conteúdo gênico de *H. seropedicae* sugere que esta bactéria usa um transportador movido a ATP, como o sistema Wzm/Wzt-dependente (Fig. 7). Neste sistema, o antígeno-O polimérico é formado na face citoplasmática da membrana interna antes de sua exportação por um transportador do tipo ABC (RAETZ e WHITFIELD, 2002; VALVANO, 2003). Após o transporte para a face externa da membrana plasmática, uma glicosiltransferase específica denominada WaaL catalisa a reação de transferência sacarídica do undecaprinil-PP-antígeno-O para o lipídeo-A-oligo central, formando a molécula completa de LPS. O LPS é então exposto na membrana externa por uma proteína exportadora de polissacarídeos (Wza) por um mecanismo a ser determinado (VALVANO, 2003, 2011; RAETZ *et al.*, 2003).





Para determinar a função dos genes na composição do LPS em *H. seropedicae* e interação com o hospedeiro foi construída uma estirpe mutante sítio-dirigido. Mutações em genes de biossíntese da porção de lipídeo-A são geralmente letais para bactérias gram negativas (EIDELS & OSBORN, 1971). Mutações em genes da biossíntese dos monossacarídeos precursores podem gerar efeitos pleiotrópicos (ORMEÑO-ORRILO *et al.*, 2008), dificultando a avaliação do fenótipo das estirpes (BALSANELLI *et al.*, 2010). Desta forma, foi escolhido o gene *waal* para mutagênese, uma vez que a O-antígeno ligase codificada seria específica para biossíntese de LPS, e mutantes sem esta porção da molécula são viáveis. Assim, fenótipos contrastantes entre as estirpes selvagem e mutante seriam reflexo da ausência de antígeno-O.

## 6.2. OBTENÇÃO DA ESTIRPE MUTANTE *H. seropedicae* LPSEB

A estratégia utilizada para a obtenção deste mutante foi a recombinação homóloga. O gene *waal* foi amplificado a partir de DNA genômico da estirpe selvagem e diretamente clonado em vetor pTZ57R/T. Após confirmação da identidade do amplicom por sequenciamento, foi inserido o cassete Tn903 no sítio EcoRV (base 805 do gene), o gene mutagenizado foi retirado com BamHI e transferido para o vetor pSUP202. Com a conjugação desta construção na estirpe selvagem de *H. seropedicae*, ocorreu o fenômeno de permuta, gerando estirpes com o gene nocauteado. Estas foram isoladas por seleção negativa (estirpes resistentes a canamicina e sensíveis a cloranfenicol), e a inserção do cassete Tn903 no genoma foi

confirmada por PCR (Fig. 8). O gene amplificado do genoma da estirpe selvagem possui 1200 bp, enquanto o gene amplificado de estirpes mutantes possui 2500 bp, referente ao cassete adicionado ao gene.

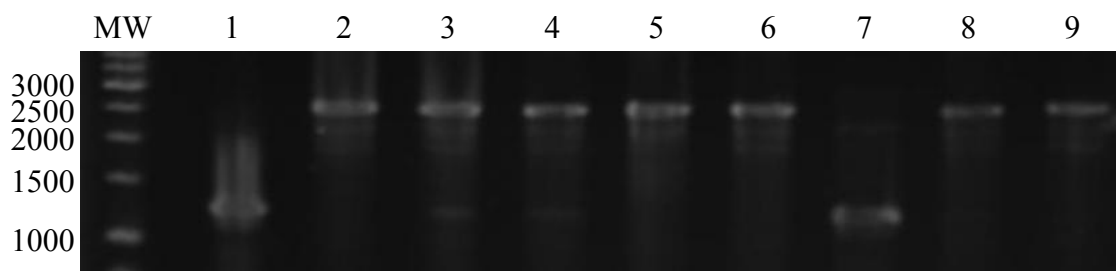


FIGURA 8 – PERFIL ELETROFORÉTICO DO GENE *waaL* AMPLIFICADO DAS ESTIRPES DE *H. seropedicae*. Células da estirpe selvagem (linha 1) e dos transconjugantes (linhas 2 a 9) foram lisadas por fervura e utilizadas para amplificação do gene *waaL*. A cópia selvagem do gene (linhas 1 e 7) possui 1200 bp, enquanto a cópia dos duplos recombinantes (linhas 2, 5, 6, 8 e 9) possui 2500 bp. Simples recombinantes apresentam as duas cópias (linhas 3 e 4). MW: padrão de massa molecular (pb).

### 6.3. *H. seropedicae* LPSEB (*waaL*<sup>-</sup>) NÃO POSSUI A PORÇÃO DE ANTÍGENO-O DO LPS

SDS-PAGE foi utilizado para determinar o padrão do LPS das estirpes de *H. seropedicae* (Fig. 9). O perfil da estirpe selvagem apresentou uma intensa banda de baixa massa molecular (BMM) e uma série de bandas de alta massa molecular (AMM) em padrão “*ladder-like*”. Comparações com perfis eletroforéticos de LPS conhecidos de outras bactérias sugerem que as bandas de BMM correspondem ao lipídeo-A ligado ao oligossacarídeo central, e as bandas de AMM às moléculas completas de

LPS com diferentes números de unidades de antígeno-O (CARLSON, 1984; BRAUN *et al.*, 2005). O LPS da estirpe mutante *waaL*<sup>-</sup> não possuem antígeno-O, e a porção de lipídeo-A ligada ao oligossacarídeo central aparentemente não apresentou alterações quando comparada ao da estirpe selvagem.

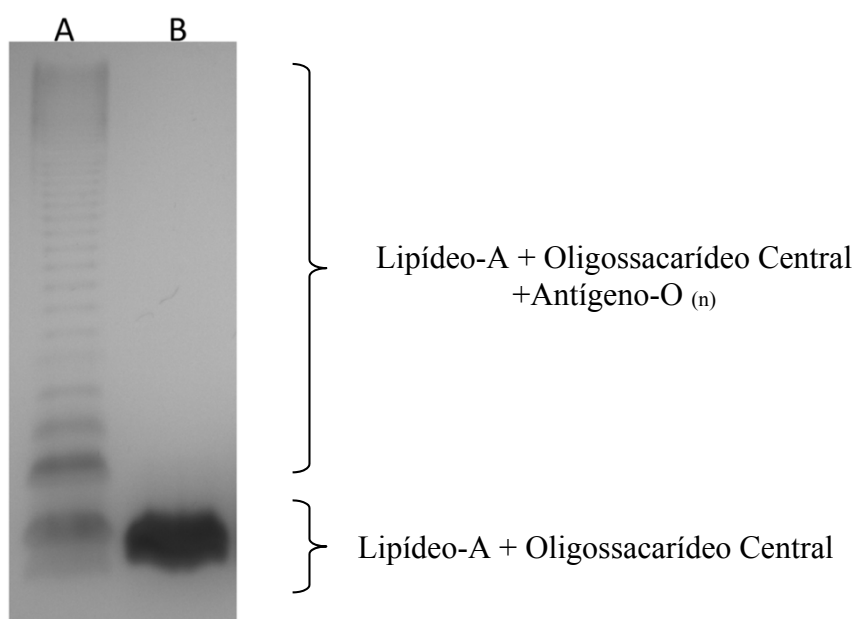


FIGURA 9 - PERFIL ELETROFORÉTICO DO LPS DAS ESTIRPES DE *H. seropedicae*. SDS-PAGE foi realizado com o LPS total extraído da estirpe selvagem (A) e da estirpe mutante *waaL*<sup>-</sup> (B) pelo método de proteinase K / SDS.

Para investigar se estas modificações tiveram consequências na interação com o hospedeiro, foram realizados ensaios de colonização em milho, avaliando a capacidade de colonização das estirpes.

#### 6.4. A PORÇÃO DE ANTÍGENO-O DO LPS É IMPORTANTE PARA COLONIZAÇÃO DE MILHO POR *H. seropedicae*

A colonização de raízes de milho por *H. seropedicae* foi seguida para avaliar a função do LPS nesta interação. O número de células selvagens aderidas na superfície radicular foi aproximadamente 100 vezes maior do que o de células do mutante LPSEB (Fig. 10). A população epifítica da estirpe mutante alcançou o mesmo nível da estirpe selvagem 4 dias após inoculação. O número de bactérias selvagens endofíticas foi 100 vezes maior que o de bactérias mutantes 24 horas após inoculação, e manteve-se constante até 10 dias após inoculação (Fig. 10). Estes resultados indicam que a porção de antígeno-O do LPS está envolvida nos processos de adesão eficiente e colonização endofítica de *H. seropedicae*.

Estas diferenças no perfil de colonização não podem ser creditadas à diferenças na velocidade de crescimento entre as estirpes, uma vez que a taxa máxima de crescimento da estirpe selvagem ( $\mu_{\max} = 0,315 \pm 0,010 \text{ h}^{-1}$ ) foi similar ao da estirpe mutante ( $\mu_{\max} = 0,308 \pm 0,012 \text{ h}^{-1}$ ).

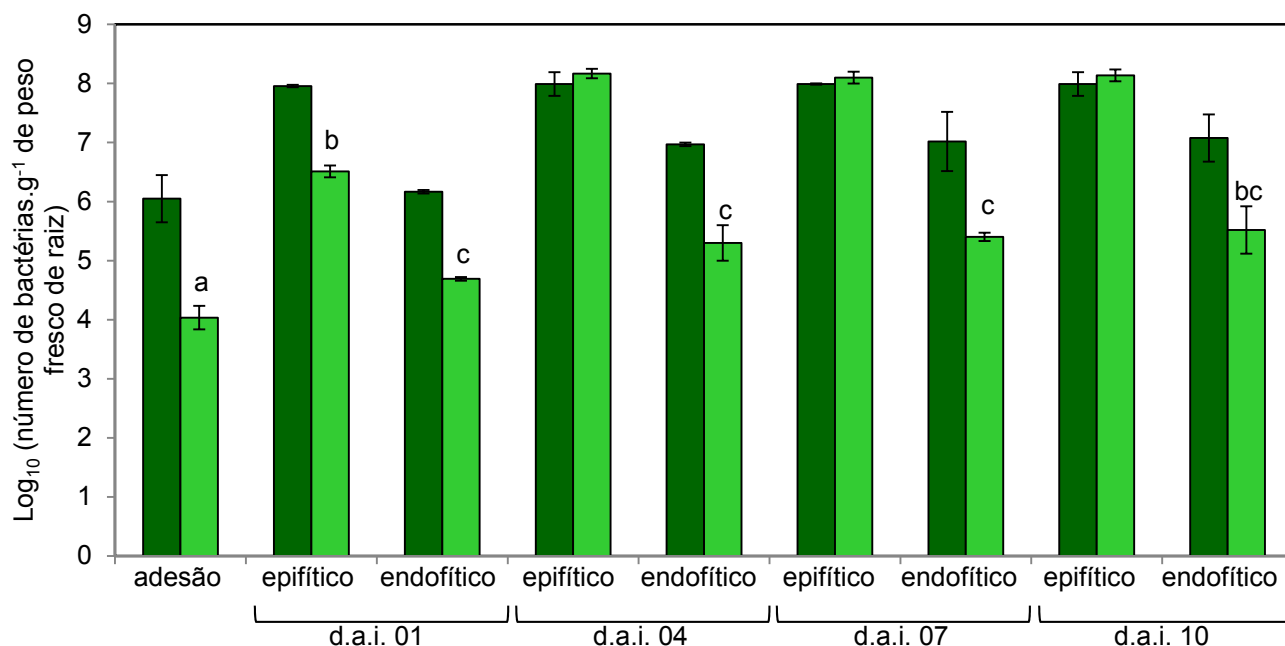


FIGURA 10 - COLONIZAÇÃO DE RAÍZES DE MILHO PELAS ESTIRPES *H. seropedicae* SELVAGEM (barras verde escuro) E MUTANTE *waaL* (barras verde claro). Plântulas de milho foram inoculadas com  $10^5$  células das estirpes de *H. seropedicae*, e o número de bactérias aderidas à raiz após lavagem foi determinado. O número de células epifíticas e endofíticas foi determinado 1, 4, 7 e 10 dias após inoculação (d.a.i.). Letras diferentes indicam diferenças significativas com  $p < 0,01$  (teste múltiplo de Duncan) na comparação entre as amostras. Resultados mostrados como média do  $\text{Log}_{10}$  (número de bactérias.g<sup>-1</sup> de raiz)  $\pm$  desvio padrão, n=15 plantas por dia e condição.

O uso de concentrações menores de bactérias para inoculação em ensaios de adesão mostrou que ambas as estirpes, selvagem e mutante, tiveram um padrão de adesão dose-dependente (Fig. 11A), embora os números de células aderidas do mutante *waaL* foram sempre menores que os da estirpe selvagem. Ensaios de co-inoculação revelaram uma clara predominância da estirpe selvagem para adesão (Fig. 11B). A inoculação de uma mistura de ambas as estirpes na proporção de 1:1 levou à

recuperação de quase exclusivamente bactérias selvagens. A estirpe mutante foi recuperada apenas quando o inóculo utilizado tinha mais de  $10^4$  UFC. Por outro lado, o perfil de colonização não foi significativamente alterado em comparação ao observado na inoculação separada.

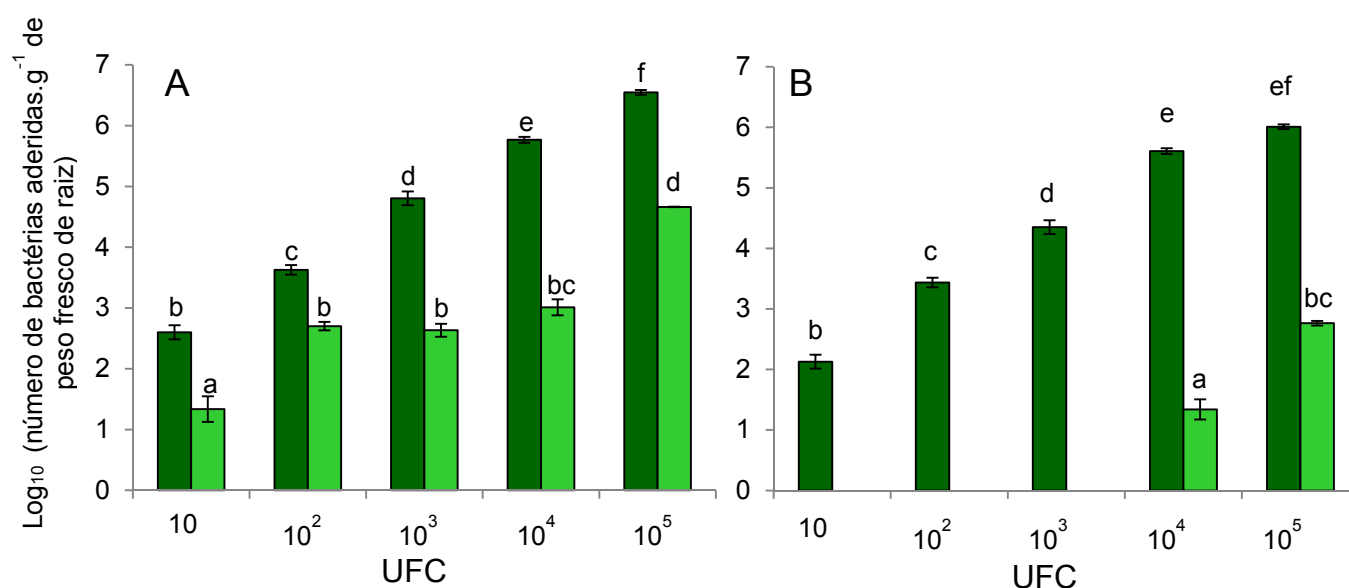


FIGURA 11 – ADESÃO EM RAÍZES DE MILHO POR DIFERENTES DOSES DE INÓCULO DE *H. seropedicae* SELVAGEM (barras verde escuro) E MUTANTE *waaL* (barras verde claro). Painel A: plântulas de milho foram inoculadas separadamente com a quantidade indicada no eixo de cada estirpe. Painel B: plântulas de milho foram inoculadas com uma mistura de ambas estirpes na proporção de 1:1. O número total de bactérias inoculadas está indicado no eixo x. UFC = unidades formadoras de colônias. Letras diferentes indicam diferenças significativas com  $p < 0,01$  (teste múltiplo de Duncan). Resultados mostrados como média do Log<sub>10</sub> (número de bactérias.g<sup>-1</sup> de raiz)  $\pm$  desvio padrão, n=9 plantas por condição.

## 6.5. LECTINAS DE MILHO MEDIAM A ADESÃO DE *H. seropedicae* À SUPERFÍCIE RADICULAR

Balsanelli e colaboradores (2010) propuseram que o LPS de *H. seropedicae* participa na adesão da bactéria ao ancorá-la em receptores vegetais por seus resíduos de N-acetil glucosamina (28.2 mol% do antígeno-O), e os resultados mostrados acima reforçam o papel do antígeno-O na interação *H. seropedicae*–milho. Para investigar se proteínas de membrana externa também estão envolvidas na adesão, as células de *H. seropedicae* selvagens foram tratadas com uma concentração não letal de proteinase K e inoculadas em raízes de milho. Não foi observada diferença na adesão entre bactérias tratadas e não tratadas (Fig. 12), sugerindo que as proteínas de membrana externa bacteriana não estão diretamente envolvidas na adesão de *H. seropedicae* em milho. Por outro lado, quando as raízes de milho foram previamente tratadas com proteinase K e então inoculadas com *H. seropedicae*, a adesão bacteriana diminuiu aproximadamente 100 vezes, sugerindo o envolvimento de uma proteína vegetal no processo de adesão. Além disso, diminuições similares foram observadas quando o ensaio foi realizado na presença de LPS purificado de *H. seropedicae* SMR1 ou N-acetil glucosamina, atingindo níveis de adesão similares ao da estirpe mutante *waaL*. Estes resultados suportam fortemente a hipótese de que o LPS bacteriano ancora *H. seropedicae* em receptores proteicos de superfície da planta.

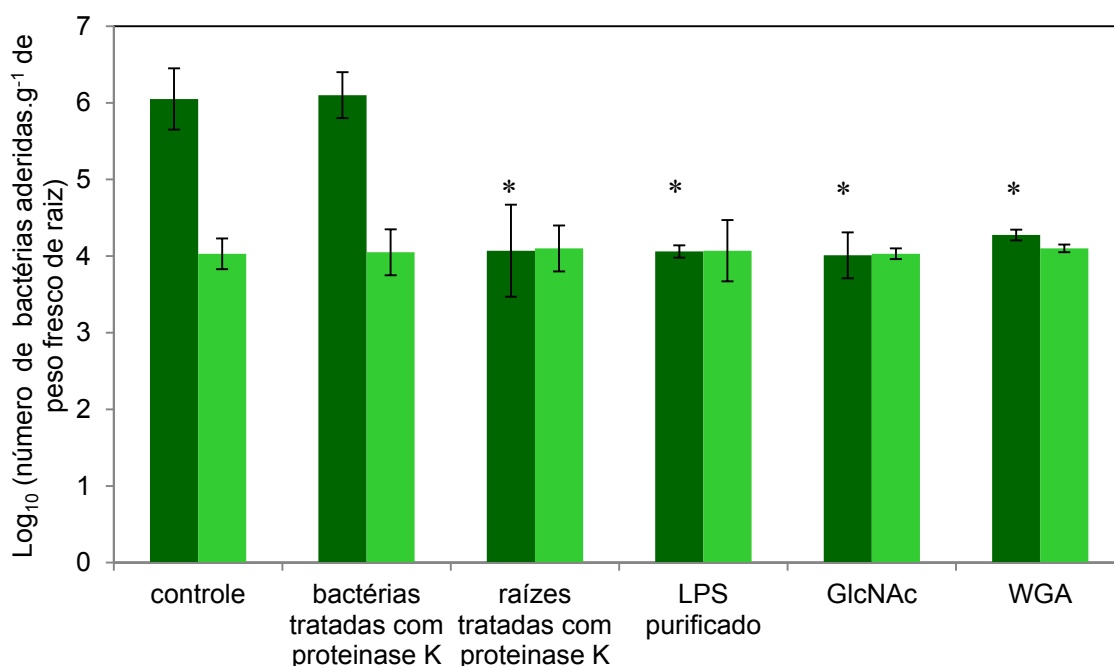


FIGURA 12 – EFEITO DE COMPETIDORES NA ADESÃO DE *H. seropedicae* EM RAÍZES DE MILHO.

*H. seropedicae* selvagem (barras verde escuro), mutante *waaL* (barras verde claro) ou raízes de milho foram incubadas com 5 µg.mL<sup>-1</sup> de proteinase K por 20 min a 30°C antes do ensaio de adesão quando indicado. LPS purificado, N-acetil glucosamina, WGA (todos 0,5 mg.mL<sup>-1</sup>) foram adicionados quando indicado. Asteriscos indicam diferenças significativas com p<0,01 (teste múltiplo de Duncan) na adesão da estirpe selvagem entre as condições controle e testes. Resultados mostrados como média do Log<sub>10</sub> (número de bactérias.g<sup>-1</sup> de raiz) ± desvio padrão, n=15 plantas por condição.

WGA (do inglês “Wheat Germ Agglutinin”) é uma lectina de trigo que tem afinidade para ligação à N-acetil glucosamina, constituindo um possível alvo de adesão radicular para *H. seropedicae*. Por isso, a capacidade de adesão de *H. seropedicae* foi avaliada na presença desta lectina como competidora (Fig. 12). A adição de WGA (0,5 mg.mL<sup>-1</sup>) à suspensão de células selvagens de *H. seropedicae* diminuiu cerca de 100 vezes a adesão bacteriana a raízes de milho e trigo, sugerindo



uma função conservada de lectinas de gramíneas na mediação da adesão de *H. seropedicae* na superfície radicular. *Azospirillum brasilense* interage com WGA provavelmente através complexos contendo polissacarídeos encontrados em sua membrana externa (KONNOVA *et al.*, 1994), logo esta bactéria deveria competir com *H. seropedicae* para adesão a raiz. Ensaio de adesão mostraram que a população de *A. brasilense* atinge o equilíbrio em  $10^4$  células por grama de raiz, enquanto *H. seropedicae* mostrou um padrão de adesão dose-dependente com máximo em  $10^7$  células por grama de raiz (Fig. 13A). Ensaio de co-inoculação revelaram uma profunda redução na adesão de ambas as estirpes, sugerindo uma competição pela ligação na superfície radicular de milho (Fig. 13B). O número de células aderidas de *H. seropedicae* foi de 100 a 1000 vezes menor durante competição comparado a inoculação separada em todas as doses de inóculo. *A. brasilense*, por outro lado, não foi recuperado da superfície radicular durante competição quando menos de  $10^3$  células foram usadas como inóculo, mas não mostrou diferença na adesão comparando com a inoculação separada nas doses maiores de inóculo. Estes resultados sugerem que as espécies bacterianas inicialmente competem pelos mesmos pontos de adesão, mas quando existem mais bactérias *A. brasilense* é capaz de aderir normalmente. A adição de GlcNAc durante os ensaios de adesão destas espécies (Fig. 13C) mostraram que a adesão de *A. brasilense* é bloqueada por esse monossacarídeo quando menos de  $10^4$  células foram usadas como inóculo, e novamente não mostrou diferença na adesão comparado a inoculação separada nas doses maiores de inóculo. A adição de GlcNAc durante os ensaios de competição

entre as espécies (Fig. 13D) inibiu completamente a adesão de *A. brasilense*. O padrão de adesão de *H. seropedicae* na presença de GlcNAc foi similar na inoculação separada e durante competição com *A. brasilense*, sugerindo que a competição para adesão entre as espécies é devida ao compartilhamento de uma mecanismo conservado na ligação de GlcNAc-receptor vegetal.

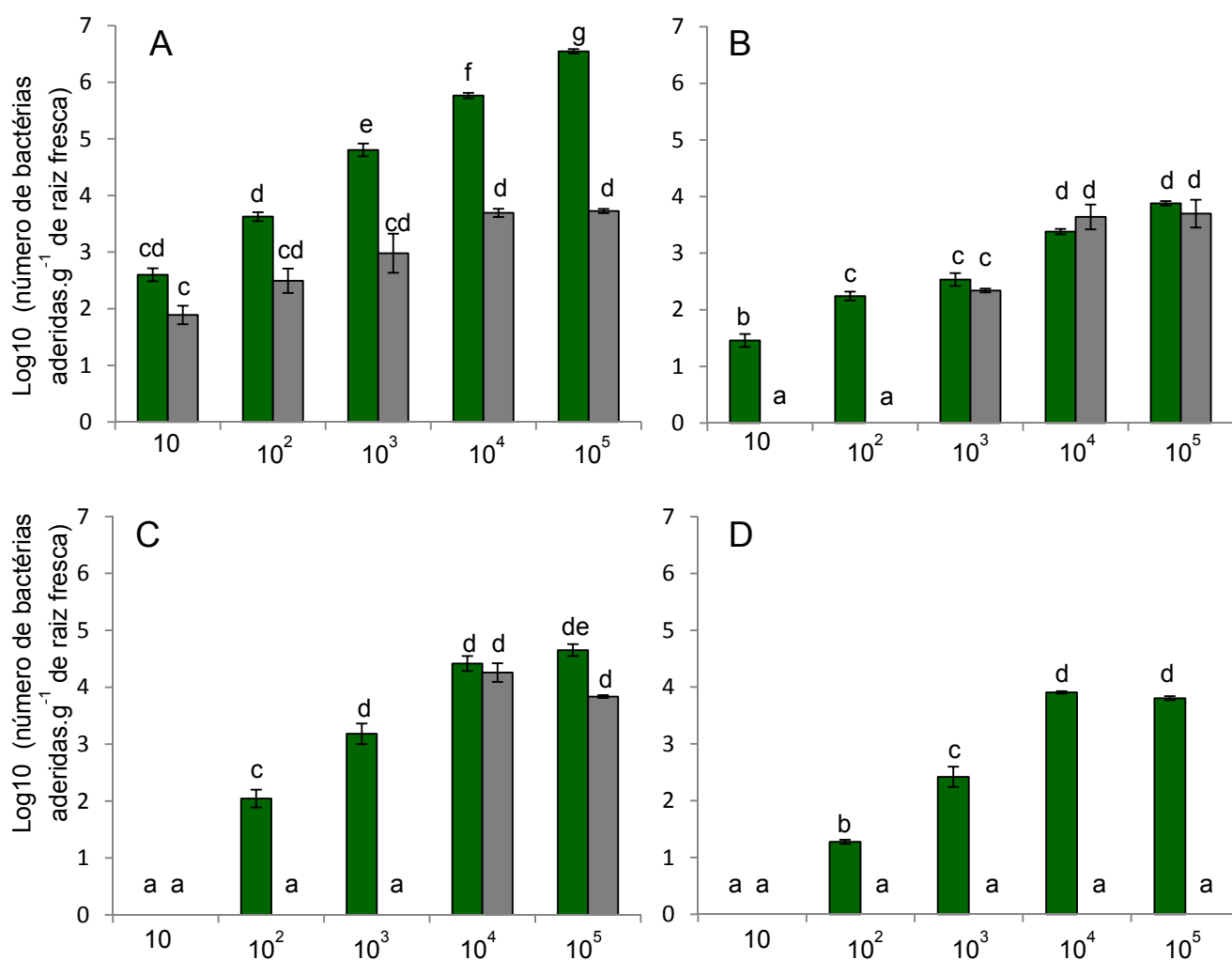


FIGURA 13 - COLONIZAÇÃO DE RAÍZES DE MILHO POR DIFERENTES DOSES DE INÓCULO DE *H. seropedicae* SELVAGEM (barras verde escuro) E *A. brasilense* (barras cinza). Painel A: plântulas de milho foram inoculadas separadamente com a quantidade indicada no eixo de cada espécie. Painel

B: plântulas de milho foram inoculadas com uma mistura de ambas espécies na proporção de 1:1. Paineis C e D: plântulas de milho foram inoculadas separadamente com a quantidade indicada no eixo de cada espécie na presença de 0,5 M de N-acetil glucosamina. Paineis E e F: plântulas de milho foram inoculadas com uma mistura de ambas espécies na proporção de 1:1 na presença de 0,5 M de N-acetil glucosamina. O número total de bactérias inoculadas está indicado no eixo x. Letras diferentes indicam diferenças significativas com  $p < 0,01$  (teste múltiplo de Duncan). Resultados mostrados como média do  $\text{Log}_{10}$  (número de bactérias.g<sup>-1</sup> de raiz)  $\pm$  desvio padrão, n=9 plantas por condição.

WGA também foi capaz de aglutinar células selvagens de *H. seropedicae*, mas não o mutante *waaL*, em um modo dependente de concentração, indicando que a lectina é capaz de ligar-se à superfície celular de *H. seropedicae* (Fig. 14). Além disso, a adição de GlcNAc ou LPS inibiu a aglutinação de *H. seropedicae*, sugerindo que a ligação ocorre através da região de antígeno-O do LPS selvagem.

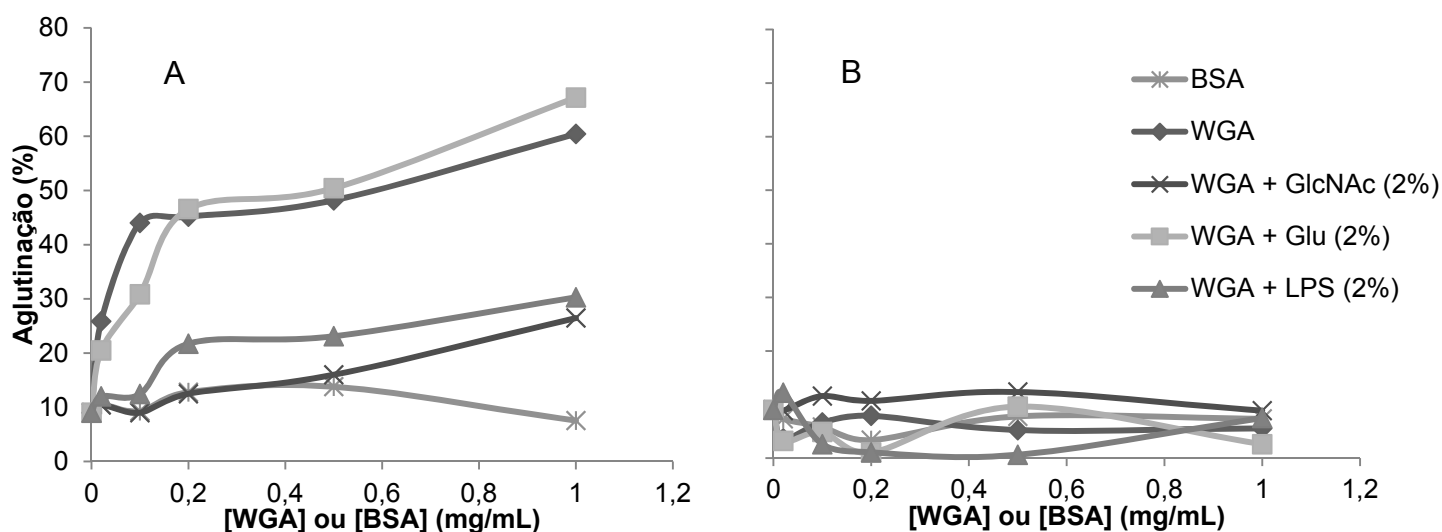


FIGURA 14 – ENSAIO DE AGLUTINAÇÃO DE *H. seropedicae* NA PRESENÇA DE WGA. A estirpe selvagem (painel A) e mutante *waaL* (painel B) crescidas até  $DO_{600nm} = 1$  foram incubadas com concentrações crescentes de WGA ou BSA (controle) durante 60 minutos a 30°C na presença ou ausência de N-acetil glucosamina, LPS selvagem purificado ou glucose (todos 2%). Agglutinação foi indicado como a percentagem de bactérias em suspensão (como  $DO_{600nm}$ ) comparado ao controle  $\pm$  desvio padrão, n=9 incubações por condição.

#### 6.5.1. Caracterização de lectinas de raiz de milho requeridas para adesão de *H. seropedicae*

Para identificar moléculas receptoras da superfície radicular foram extraídas proteínas totais de raízes de milho, e moléculas tipo-lectina foram purificadas por cromatografia de afinidade em coluna de GlcNAc-agarose (Fig. 15). Duas frações proteicas (A e B) foram eluídas usando 0,5M de GlcNAc. A fração A apresentou duas

bandas principais (35 kDa e 34 kDa) que foram denominadas MRL-1 e MRL-2. A fração B apresentou uma banda (38 kDa) indicada como MRL-3.

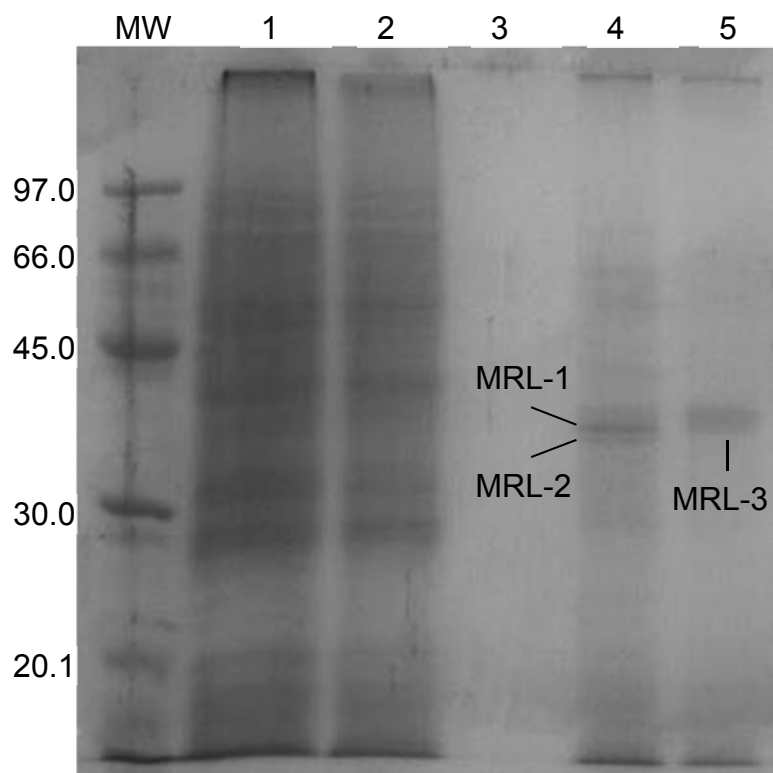


FIGURA 15 – ELETROFORESE DAS FRAÇÕES DE PURIFICAÇÃO DE LECTINAS DE RAIZ DE MILHO POR SDS-PAGE 12%. Lectinas de milho foram purificadas utilizando cromatografia de afinidade em coluna de GlcNAc-agarose. Linhas: MW – marcadores de massa molecular (em kDa); 1: extrato total de raiz de milho; 2: extrato após passagem pela coluna; 3: amostra da última lavagem; 4 e 5: frações proteicas eluídas com 0,5 M de GlcNAc. MRL-1, MRL-2 e MRL-3 indicam as lectinas de raiz de milho. As proteínas foram coradas com Coomassie blue.

As bandas foram analisadas utilizando a identificação dos peptídeos tripticos por espectrometria de massa tipo MALDI-TOF (Tabela 5). As proteínas MRL-1 e MRL-2 são similares a proteínas de milho não-caracterizadas induzidas por jasmonato. Ambas apresentam um domínio tipo-dirigente, que é expresso em plantas durante resposta de resistência a doenças e lignificação (FRISTENSKY *et al.*, 1988, BURLAT *et al.*, 2001), e um domínio tipo-jacalina com seis sítios de ligação a açúcares que podem ligar mono ou oligossacarídeos com alta especificidade (RAVAL *et al.*, 2004) (Fig. 16A). MRL-3 foi previamente identificada como uma proteína de milho não-caracterizada e contém dois domínios cadeia B, com resíduos aromáticos que podem interagir com a face não polar dos açúcares e resíduos polares para formação de pontes de hidrogênio aos grupos hidroxilas dos açúcares (BORASTON *et al.*, 2004) (Fig. 16B). MRL-1 compartilha 74% de identidade com MRL-2, mas MRL-3 não apresenta similaridade com MRL-1 e MRL-2. Estas três proteínas não haviam sido previamente caracterizadas.

TABELA 5 – IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS TIPO-LECTINA ISOLADAS DE RAIZ DE MILHO (MRL) POR SPECTROSCOPIA MALDI-TOF.

	MRL-1	MRL-2	MRL-3
<b>PMF</b> <sup>a</sup>	B4FN23_MAIZE Proteína não-caracterizada induzida por jasmonato	B4F7S2_MAIZE Proteína não-caracterizada induzida por jasmonato	B4G0K5_MAIZE Proteína não-caracterizada
<b>Cobertura de sequência</b> <sup>b</sup>	28% (10)	18% (7)	41% (14)
<b>Identidade</b> <sup>c</sup>	-gb EES17612.1  proteína hipotética SORBIDRAFT_09g001880 [ <i>Sorghum bicolor</i> ] (63%) -gb AAR20919.1  proteína induzida por jasmonato [ <i>Triticum aestivum</i> ] (41%) -gb ABB51090.1  lectina relacionada a jacalina com especificidade a manose [ <i>Oryza sativa</i> Japonica Group] (40%)	-gb EES17612.1  proteína hipotética SORBIDRAFT_09g001880 [ <i>Sorghum bicolor</i> ] (62%) -gb AAR20919.1  proteína induzida por jasmonato [ <i>Triticum aestivum</i> ] (44%) -gb ABB51090.1  lectina relacionada a jacalina com especificidade a manose [ <i>Oryza sativa</i> Japonica Group] (44%)	-gb EER92327.1  proteína hipotética SORBIDRAFT_01g036580 [ <i>Sorghum bicolor</i> ] (92%) -gb ABF95713.1  proteína QXW da família das lectinas [ <i>Oryza sativa</i> Japonica Group] (45%) -gb ABW73994.1  lectina 2 [ <i>Euonymus europaeus</i> ] (42%)

<sup>a</sup> As comparações de massa dos peptídeos (PMF) ao banco de dados (NR e genoma de milho) e a cobertura das sequências foram obtidas utilizando o programa MASCOT.

<sup>b</sup> Número de íons  $m/z$  usados na busca.

<sup>c</sup> Alinhamento proteico realizado com o programa PSI-Blastp (<http://ncbi.nlm.gov/BLAST/>).

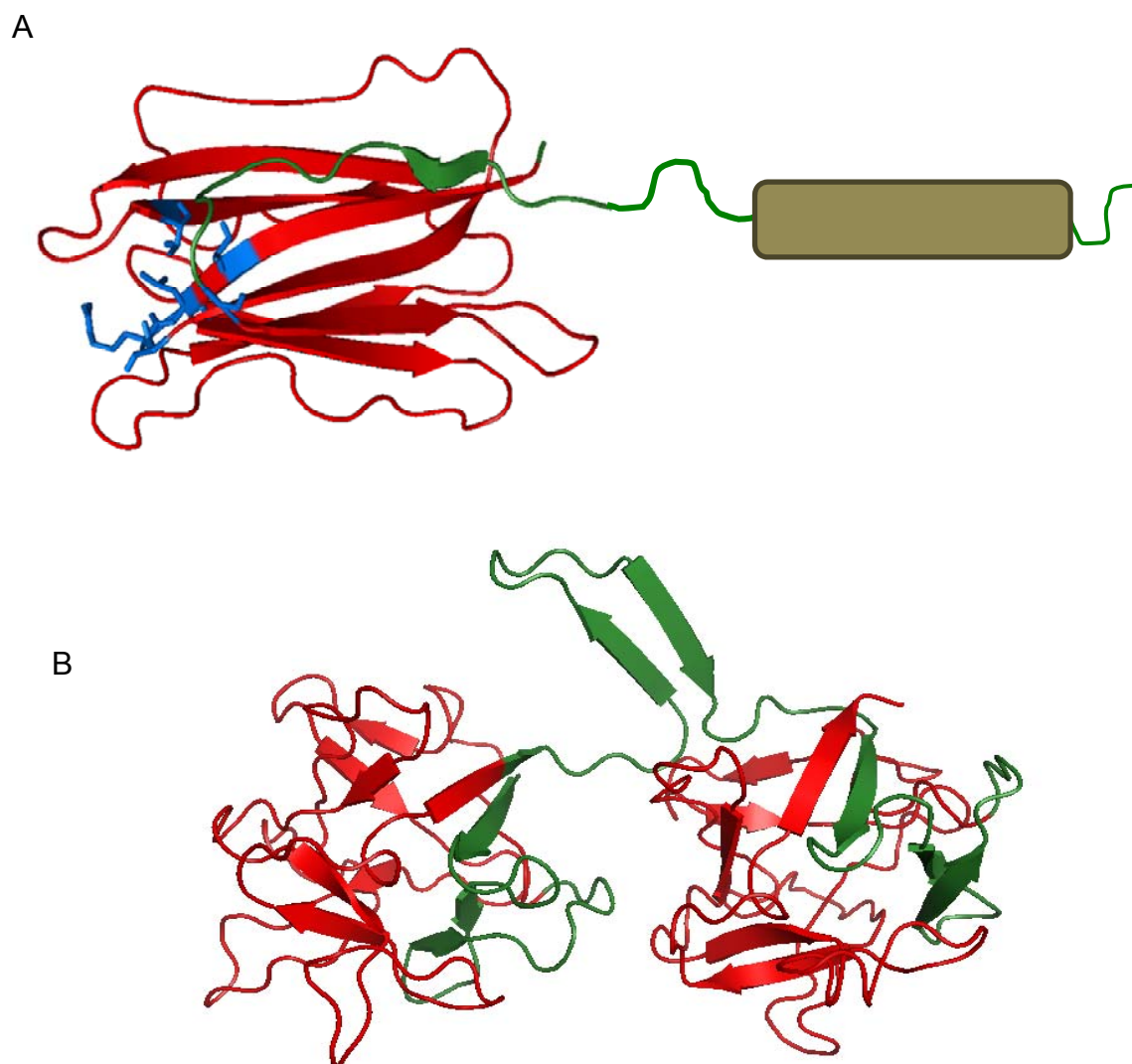


FIGURA 16 – MODELOS ESTRUTURAIS DAS LECTINAS DE RAIZ DE MILHO IDENTIFICADAS. (A) MRL-1 ou MRL-2 apresentam um domínio dirigente (marrom) C-terminal e um domínio jacalina (vermelho) N-terminal. Os resíduos G188, T266, S309, R310, L311 e A313 (azul) constituem o provável sítio de ligação à GlcNAc. (B) MRL-3 apresenta dois domínios cadeia B (vermelho). Os domínios e sítios de ligação foram identificados pelo programa PFAM, as prováveis estruturas foram geradas pelo SwissModel (e value <  $e^{-5}$ ).



A presença de MRL-1 e 2 ou MRL-3 ( $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) diminuiu a adesão da estirpe selvagem 80 vezes (Fig. 17), sugerindo que elas constituem sítios na superfície da raiz envolvidos na adesão de *H. seropedicae*.

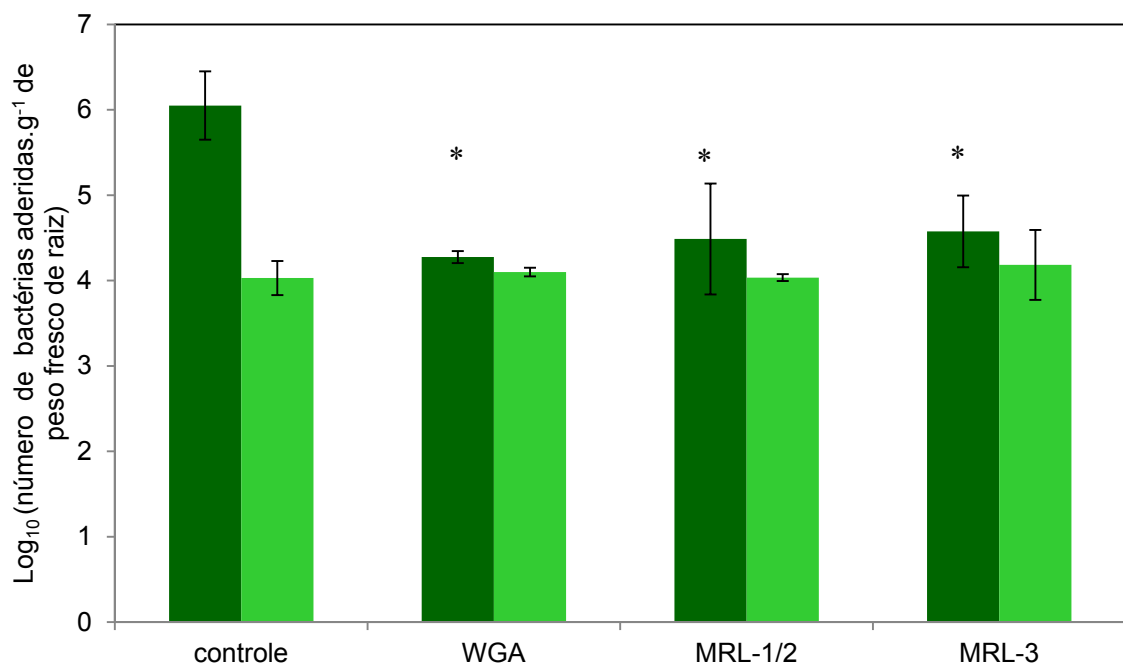


FIGURA 17 – EFEITO DE LECTINAS NA ADESÃO DE *H. seropedicae* EM RAÍZES DE MILHO. *H. seropedicae* selvagem (barras verde escuro) e mutante *waal* (barras verde claro) foram incubadas com WGA ou MRLs (todos  $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) imediatamente antes do ensaio de adesão. Asteriscos indicam diferenças significativas com  $p < 0,01$  (teste múltiplo de Duncan) na adesão da estirpe selvagem entre as condições controle e testes. Resultados mostrados como média do  $\text{Log}_{10}$  (número de bactérias.g<sup>-1</sup> de raiz)  $\pm$  desvio padrão,  $n=9$  plantas por condição.

Frações contendo MRL-1 e MRL-2 (0,5 mg.mL<sup>-1</sup>), ou MRL-3 (0,5 mg.mL<sup>-1</sup>) foram testadas para atividade de aglutinação contra *H. seropedicae* (Fig. 18). Ambas as frações apresentaram aglutinação contra a estirpe selvagem, em um nível similar ao observado com WGA. Em ambos os casos a atividade de aglutinação foi severamente reduzida na presença de GlcNAc. Em contraste, não foi observada aglutinação da estirpe mutante *waaL* na presença de qualquer lectina, provavelmente pela falta de antígeno-O que contenha GlcNAc.

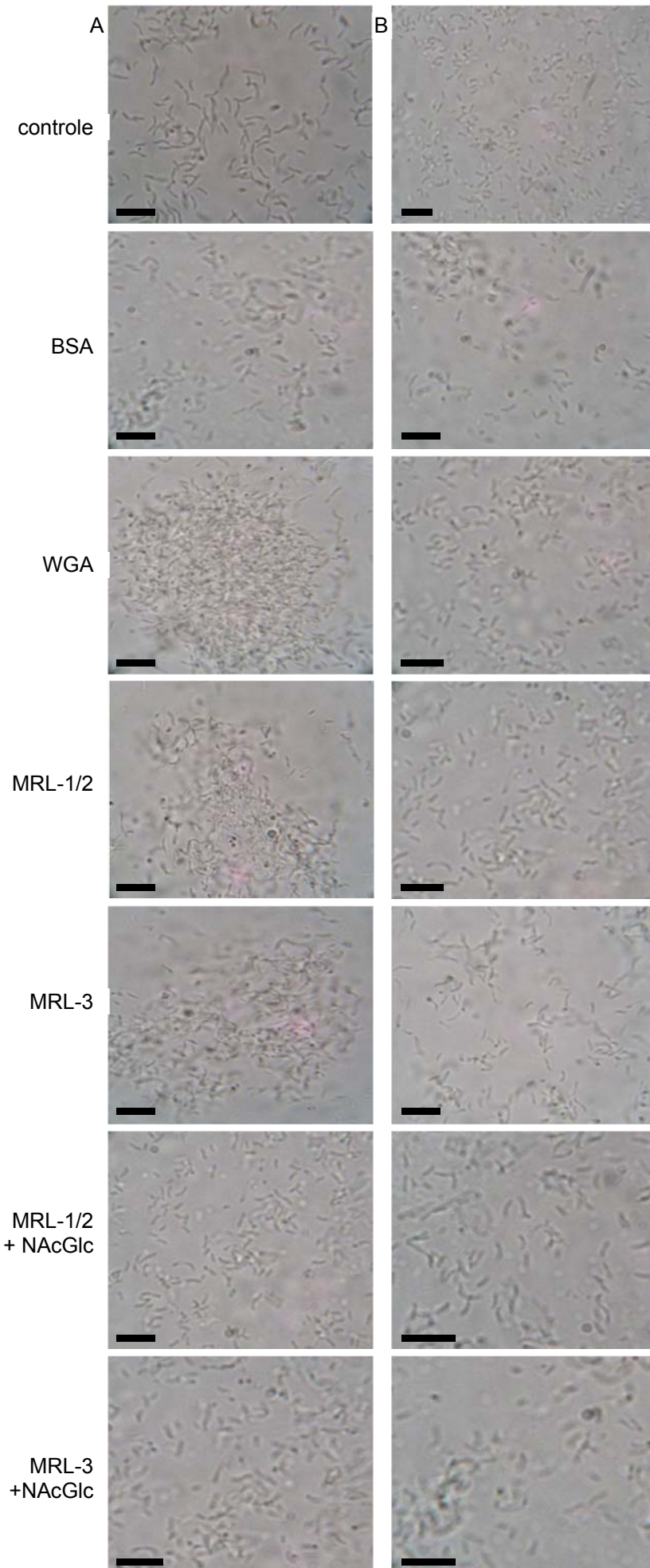


FIGURA 18 – MICROSCOPIA ÓTICA DE *H. seropedicae* SELVAGEM (A) E *waal* (B). As culturas de células foram colocadas em lâminas de vidro, misturadas com BSA, WGA ou MRLs (todos 0,5 mg.mL<sup>-1</sup>) na ausência e presença de NAcGlc (2%) e analisadas por microscopia ótica convencional. Controle na presença de solução salina; barras = 10 µm; n=5 lâminas por condição.

## 6.6. ADESÃO DE *H. seropedicae* NAS RAÍZES DE MILHO INDUZEM A BIOSSÍNTESE DE LPS

Para determinar a regulação da expressão dos genes envolvidos na biossíntese de LPS foram construídas as estirpes *H. seropedicae* pLig e pTransp, que carregam a fusão plasmidial do promotor do gene *waal* e operon *rfaLmsbAHsero3567rfaJJ2* com o gene repórter *lacZ*. A primeira fusão avalia a regulação da montagem da molécula completa de LPS, enquanto a segunda avalia a regulação do transporte e montagem da porção lipídeo A-oligo central.

### 6.6.1. Obtenção das estirpes *H. seropedicae* pLig e *H. seropedicae* pTransp

A região a montante do gene *waal* (375 bp) e do gene *rfaL* (1025 bp) foram amplificadas a partir do DNA genômico da estirpe selvagem e diretamente clonadas em vetor pTZ57R/T. Após confirmação da identidade dos amplicons por sequenciamento, eles foram transferidos *in frame* para o vetor pPW202, a montante do gene repórter *lacZ*. Com a conjugação destas construções na estirpe selvagem de

*H. seropedicae*, foram geradas estirpes contendo os plasmídeos pLig e pTransp. Estas foram então isoladas por seleção positiva (estirpes resistentes à tetraciclina e expressando *LacZ*).

#### 6.6.2. Regulação da expressão dos genes de montagem e transporte de LPS de *H. seropedicae*

Uma vez que o LPS intacto é requerido para maximizar a interação de *H. seropedicae* com a planta, sua biossíntese deve ser regulada por sinais de origem vegetal. Balsanelli e colaboradores (2010) mostraram que genes responsáveis pela biossíntese de ramnose, um monossacarídeo constituinte do LPS, são induzidos por compostos de origem vegetal, como flavonóides e íons cálcio. Assim, a expressão do gene *waaL* e operon *rfaLmsbAHsero3567rfaJJ2* de *H. seropedicae* foi primeiramente analisada na presença de íons cálcio (Fig. 19).

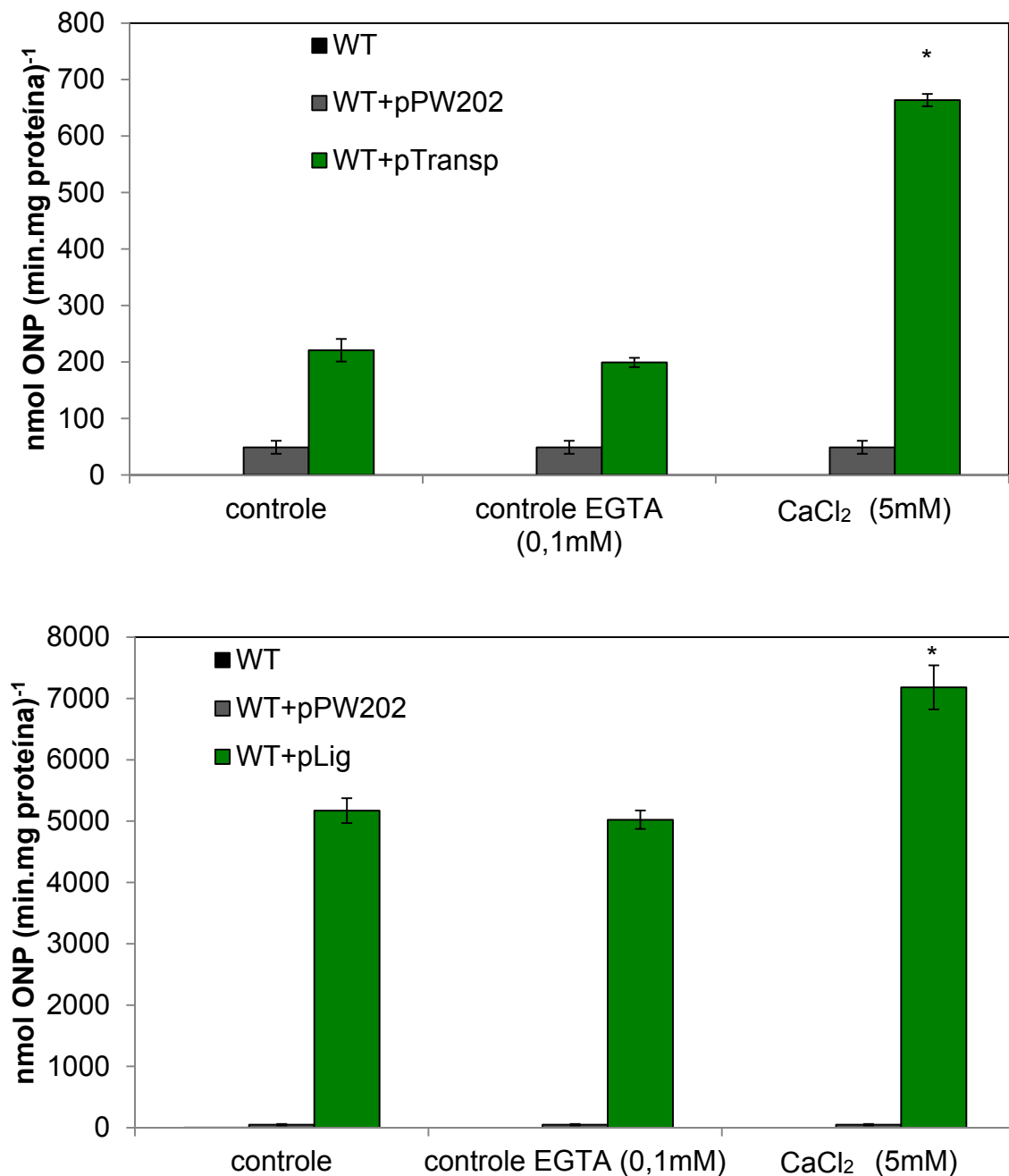


FIGURA 19 – REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES DE BIOSSÍNTESE DE LPS DE *H. seropedicae* POR ÍONS CÁLCIO “*in vitro*”. As estirpes selvagem (barras pretas) e com os plasmídeos pPW202 (barras cinza), pLig ou pTransp (barras verde) foram crescidas em meio NFbHPN por 6 horas na ausência de cálcio (controle), com a adição do quelante EGTA (0,1 mM) ou na presença de cálcio (5 mM), e então a atividade de  $\beta$ -galactosidase das culturas foi determinada e padronizada pela concentração de proteína total. Valores expressos em nmol ONP.(min.mg de proteína)<sup>-1</sup>  $\pm$  desvio

padrão. Asterisco indica diferença significativa ( $p < 0,001$ , teste  $t$  de Student) entre condição controle e teste.  $n=8$  culturas por condição.

A adição de íons cálcio (5mM) aumentou 3 vezes a transcrição dos transportadores de LPS em *H. seropedicae*, enquanto que a transcrição de *waal* foi aumentada em 30%. Estes resultados sugerem que os íons cálcio possivelmente atuam como indutores da expressão de genes necessários para a colonização do hospedeiro por *H. seropedicae*, incluindo os de biossíntese de LPS. Íons cálcio têm uma importante função como fatores de reconhecimento de hospedeiros e especificidade em muitas bactérias (ECONOMOU *et al.*, 1990; EHRHARDT *et al.*, 1996; GEHRING *et al.*, 1997; FELLE *et al.*, 1998; e BROUGHTON *et al.*, 2006). Além disso,  $Ca^{+2}$  está envolvido em uma variedade de processos celulares bacterianos, incluindo ciclo celular e divisão, motilidade, patogênese e quimiotaxia (MICHIELS *et al.*, 2002; DOMINGUEZ, 2004). Mudanças na concentração intracelular de  $Ca^{+2}$  também alteram estabilidade e atividade de várias enzimas, indicando que  $Ca^{+2}$  pode atuar como regulador metabólico (RAMPERSAUD, 1991; HOLLAND, 1999; MICHIELS *et al.*, 2002; e DOMINGUEZ, 2004). Uma hipótese alternativa é que sinais derivados do hospedeiro poderiam aumentar a concentração intracelular de  $Ca^{+2}$  em *H. seropedicae* desencadeando a transcrição de genes envolvidos na colonização de plantas inclusive em baixas concentrações extracelulares de  $Ca^{+2}$ . O mecanismo de regulação da transcrição dependente de  $Ca^{+2}$  em *H. seropedicae* ainda não foi determinado, uma vez que não puderam ser identificadas prováveis sequências

promotoras ou regulatórias próximas aos agrupamentos gênicos de biossíntese de LPS.

Para avaliar a expressão do LPS de *H. seropedicae* durante a interação com o hospedeiro, as estirpes de *H. seropedicae* contendo os plasmídeos pLig ou pTransp foram inoculadas em plantas de milho em sistema hidropônico (Fig. 20). Neste sistema foi possível avaliar a expressão gênica das bactérias plantônicas na presença de exudatos vegetais e das bactérias aderidas à raiz da planta.



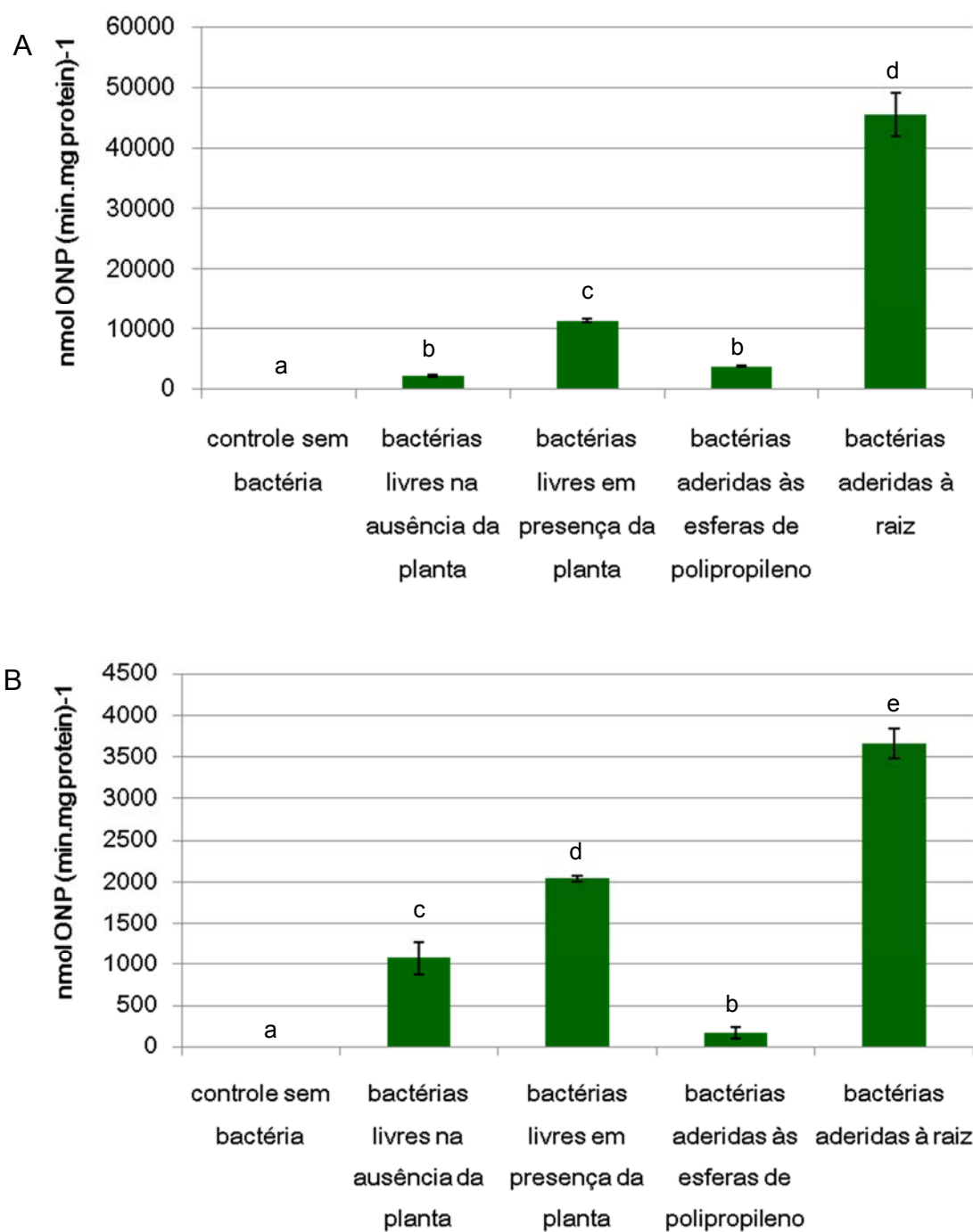


FIGURA 20 – REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES DE BIOSSÍNTESE DE LPS DE *H. seropedicae* NO RIZOPLANO.  $10^8$  UFC de *H. seropedicae* com os plasmídeos pLig (A) ou pTransp (B) foram inoculadas em sistema hidropônico. Após 24 horas, as células do meio hidropônico foram concentradas por centrifugação e então sua atividade de  $\beta$ -galactosidade foi determinada e padronizada pela concentração de proteína total. As células aderidas às raízes ou às esferas de polipropileno (controle de adesão sem planta) foram retiradas por vórtex, concentradas por

centrifugação e então a atividade específica foi determinada. Valores expressos em nmol ONP.(min.mg de proteína)<sup>-1</sup> ± desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa (teste múltiplo de Duncan) entre as condições. n=12 amostras por condição.

A expressão de *waaL* aumentou 3 vezes na presença da plântula de milho, e cerca de 10 vezes durante a adesão da bactéria à superfície radicular (Fig. 20A). Balsanelli e colaboradores (2010) observaram um aumento do grau de polimerização do LPS de *H. seropedicae* em presença de íons cálcio e naringenina. Assim, esses resultados indicam que moléculas sinalizadoras vegetais induzem a um aumento da expressão da antígeno-O ligase, que é provavelmente responsável pela modificação no grau de polimerização do LPS. A expressão do operon de transportadores também foi induzida pela presença da planta (2 vezes), assim como durante a adesão à superfície radicular (3,5 vezes). Esses resultados sugerem que além do aumento do grau de polimerização do LPS, moléculas sinalizadoras produzidas pelas plantas de milho induzem a produção e transporte de um maior número de moléculas de LPS. A indução dos genes de biossíntese de LPS parece ocorrer especificamente durante interação com o hospedeiro, uma vez que o nível de expressão destes genes nas bactérias aderidas às esferas de polipropileno é reduzido. Estes resultados enfatizam a importância do LPS durante os primeiros estágios de colonização do hospedeiro.

## 6.7. PAPEL DO LPS DE *H. seropedicae* NA INTERAÇÃO COM O HOSPEDEIRO

A adesão de bactérias do solo a células radiculares é um passo inicial requerido nas interações associativas. Foi previamente reportado que o LPS intacto é requerido para adesão e colonização endofítica de raízes de milho por *H. seropedicae*, e sugerido que ele é necessário para a ancoragem da bactéria em receptores vegetais e para resistir às defesas químicas da planta (BALSANELLI *et al.*, 2010). Neste estudo foi mostrado que a presença da porção de antígeno-O do LPS é essencial para uma colonização eficiente, função esta suportada pela indução da expressão dos genes de biossíntese de LPS durante colonização do rizoplane. Os resultados suportam a hipótese que *H. seropedicae* usa o LPS para aderir em receptores proteicos vegetais possivelmente pelo reconhecimento e ligação a lectinas radiculares.

Ensaio de inoculação em milho usando uma estirpe mutante (LPSEB) para o gene codificante da antígeno-O ligase (*waaL*) mostrou que o antígeno-O do LPS de *H. seropedicae* é necessário para a adesão epifítica inicial. Além disso, a diminuição da colonização endofítica causada pela falta de antígeno-O foi observada até 10 dias após inoculação. Isto sugere uma função importante do LPS contra as defesas basais da planta. Em outras rizobactérias como *Pseudomonas fluorescens*, *Azospirillum brasilense* e *R. tropici* CIAT899, alterações na estrutura do LPS também reduziram a colonização rizosférica e endofítica (SIMONS *et al.*, 1996; DUIJFF *et al.*, 1997; DEKKERS *et al.*, 1998; JOFRE *et al.*, 2004, ORMEÑO-ORRILLO *et al.*, 2008), mas o papel do LPS nestas interações não é claro.

Os dados apresentados sugerem que proteínas de superfície bacteriana não são requeridos para a adesão inicial de *H. seropedicae* às raízes de milho, uma função aparentemente preenchida pelo LPS. Por outro lado, a presença de proteínas de superfície radicular aumenta a adesão de *H. seropedicae*. Além disso, frações contendo três proteínas de raiz de milho tipo lectinas purificadas de uma coluna de GlcNAc-agarose diminuíram a adesão da estirpe selvagem de *H. seropedicae* às raízes. A lectina WGA também diminuiu a adesão da estirpe selvagem de *H. seropedicae* às raízes de milho, mas não a adesão do mutante LPSEB. Assim, é sugerido um modelo em que os resíduos de N-acetil glucosamina do antígeno-O do LPS se ligam nas lectinas de raiz de milho (MRL1, 2 e 3). Lectinas expostas na superfície radicular devem interagir com bactérias da rizosfera devido a suas habilidades de distinguir entre as estruturas sacarídicas dos polissacarídeos bacterianos.

O papel das lectinas na interação de gramíneas com bactérias associativas é pouco compreendido. A aglutinina de gérmen de trigo (WGA) está presente nas superfícies de plântulas de trigo e nas extremidades das raízes de plantas de trigo adultas (MISHKIND *et al.*, 1983), e deve portanto constituir um sítio para adesão específica de rizobactérias, contribuindo para a ancoragem à raiz (DEL GALLO *et al.*, 1989). As previamente não-caracterizadas lectinas de milho ligantes de GlcNAc identificadas neste trabalho possuem homólogos em outras gramíneas como trigo, arroz e sorgo, plantas que são densamente colonizadas por *H. seropedicae*. De fato, lectinas de vários cereais como trigo, centeio, cevada e arroz são relacionadas e

podem ser inibidas por GlcNAc e seus oligômeros (STINISSEN *et al.*, 1985). Os ensaios de competição entre *H. seropedicae* e *A. brasilense* mostraram que diferentes espécies contendo GlcNAc nos polissacarídeos da cápsula competem para colonizar raízes de milho (e provavelmente outras gramíneas), e que a estrutura destes polissacarídeos deve contribuir na determinação da especificidade da interação planta-bactéria. A interação entre o antígeno-O do LPS e as MRLs é um passo chave para o estabelecimento da bactéria na raiz aumentando a adesão de *H. seropedicae* e conferindo uma vantagem competitiva durante a colonização da superfície radicular.

#### 6.8. ANÁLISES *in silico* DA VIA DE BIOSÍNTESE DE EPS EM *H. seropedicae*

Durante a análise do genoma de *H. seropedicae* encontramos um agrupamento de 28 genes codificantes para proteínas envolvidas na biossíntese e secreção de EPS (ANEXO 5; Fig. 21). A organização destes genes é muito similar ao agrupamento gênico *eps* de *Herminiimonas arsenicoxydans* (MULLER *et al.*, 2007) e de *Methylobacillus* sp. 12S (YOSHIDA *et al.*, 2003), incluindo uma alta homologia entre os genes correspondentes. O EPS produzido por *Methylobacillus* sp. 12S, denominado metanolana, é um heteropolímero composto de glucose, galactose e manose na razão molar de 3:1:1 (YOSHIDA *et al.*, 2000). A análise dos genes do cluster *eps* de *H. seropedicae* que codificam para glucosiltransferases e proteínas

modificadoras de açúcares (como epimerases e fosfatases) sugere que o EPS seja composto destes mesmos açúcares. De fato, análises de composição monossacarídica do EPS de *H. seropedicae* Z67 mostraram como constituintes açúcares neutros na proporção de 4 galactoses : 3 glucoses : 1 manose, com possível substituição com ácidos tetracarboxílicos (SMOL'KINA *et al.*, 2012).

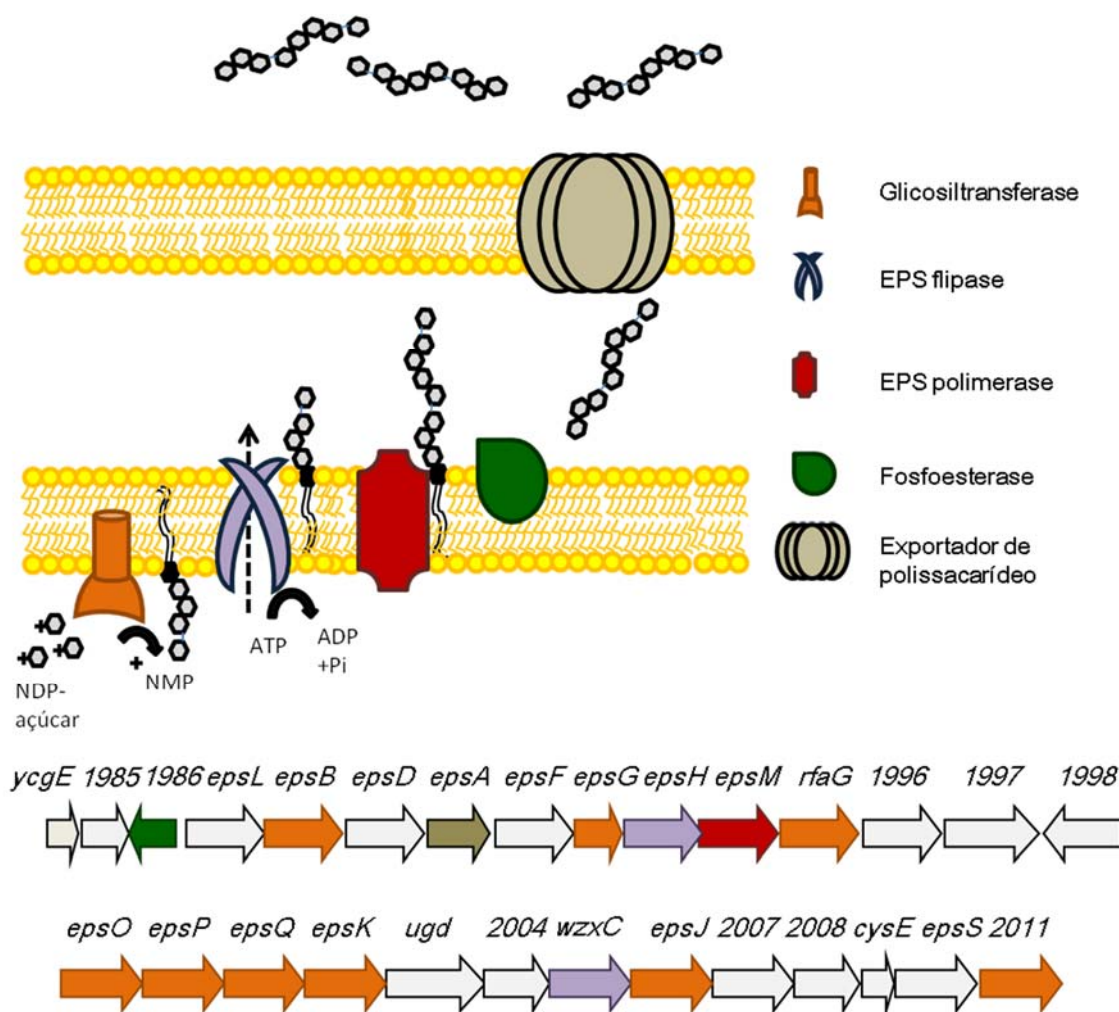


FIGURA 21 – MODELO DE BIOSÍNTESE DE EPS EM *H. seropedicae* SMR1. Com base no conteúdo gênico de *H. seropedicae* foi gerada a provável via de biossíntese e exportação do EPS. Glucosiltransferases transferem monossacarídeos para um carreador de ácido graxo (como undecaprinil) até a formação de uma unidade polimérica. Esta é transportada para a face externa da membrana interna por uma sortase ou flipase, e então ligada a outras unidades por uma polimerase. A

porção oligossacarídica da molécula é então separada do carreador lipídico por uma fosfoesterase, e secretada por uma proteína exportadora de polissacarídeos. As cores dos genes representados correspondem às prováveis proteínas codificadas no esquema. *ycgE* codifica para um regulador transcricional; *Hsero\_1985* para acetiltransferase; *Hsero\_1986* para fosfoesterase; *epsL*, *epsF* para biossíntese de EPS; *epsB*, *epsG*, *rfaG*, *epsO*, *epsP*, *epsQ*, *epsK*, *Hsero\_2004*, *epsJ* e *Hsero\_2011* para glicosiltransferases; *epsD* para peptidil-prolil isomerase; *epsA* para exportador de polissacarídeo de membrana externa; *epsH* para sortase; *epsM* para polimerase; *Hsero\_1996*, *Hsero\_1997* e *Hsero\_2007* para aciltransferases; *Hsero\_1998* e *Hsero\_2008* para hipotéticas conservadas; *ugd* para glucose hidratase; *wzxC* para flipase, *cysE* para serina acetiltransferase; e *epsS* para Gal-4-epimerase. Escala 1 cm = 1 Kb.

#### 6.9. OBTENÇÃO DA ESTIRPE MUTANTE *H. seropedicae* EPSEB

A estratégia utilizada para a obtenção deste mutante foi a recombinação homóloga. O gene *epsB* foi amplificado a partir do DNA genômico da estirpe selvagem e diretamente clonado em vetor pTZ57R/T. Após confirmação da identidade do amplicom por sequenciamento, foi inserido o cassete Tn903 no sítio EcoRV (base 776 do gene), o gene mutagenizado foi retirado com BamHI e transferido para o vetor pSUP202. Com a conjugação desta construção na estirpe selvagem de *H. seropedicae*, ocorreu o fenômeno de permuta, gerando estirpes com o gene nocauteado. Estas foram isoladas por seleção negativa (estirpes resistentes a canamicina e sensíveis a cloranfenicol), e a inserção do cassete Tn903 no genoma foi confirmada por PCR (Fig. 22).

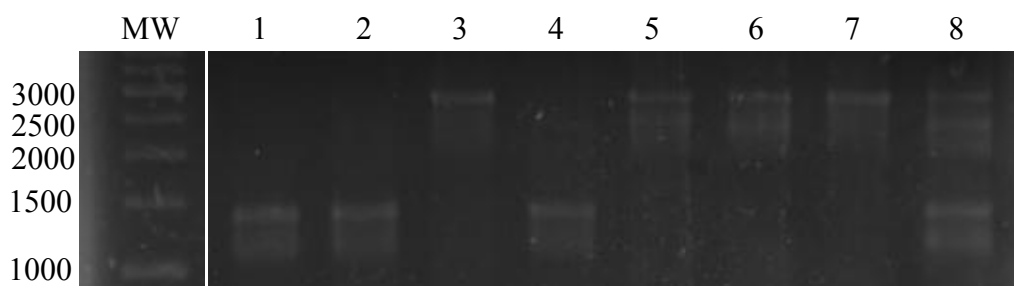


FIGURA 22 – PERFIL ELETROFORÉTICO DO GENE *epsB* AMPLIFICADO DE ESTIRPES DE *H. seropedicae*. Células da estirpe selvagem (linha 1) e dos transconjugantes (linhas 2 a 8) foram lisadas por fervura e utilizadas para amplificação do gene *epsB*. A cópia selvagem do gene (linhas 1, 2 e 4) possui 1350 bp, enquanto a cópia dos duplos recombinantes (linhas 3, 5, 6, e 7) possui 2500 bp. Simples recombinantes apresentam as duas cópias (linha 8). MW: padrão de massa molecular (pb).

#### 6.10. MUTAÇÃO EM *epsB* DIMINUI PRODUÇÃO DE EPS POR *H. seropedicae*

A produção de EPS foi inicialmente avaliada pela precipitação do sobrenadante de culturas das estirpes de *H. seropedicae* com 3 volumes de etanol absoluto a frio e dosagem de açúcar total com fenol/ácido sulfúrico. Quando as estirpes de *H. seropedicae* foram cultivadas em meio NFbHPN líquido por 16h, 30°C e 120rpm, não foi detectada produção significativa de EPS no sobrenadante da cultura.

A produção de EPS é altamente dependente de condições fisiológicas reguladas por pH, temperatura, aeração e fonte de carbono (PACE & RHIGELATO, 1980). Uma vez que uma função comumente descrita para EPS bacteriano é a formação de



biofilme, a produção de EPS e o efeito da mutação em *epsB* foram avaliados durante adesão de *H. seropedicae* em lã de vidro. Após 12 horas de crescimento, foi recuperado 0,8 mg.mL<sup>-1</sup> de EPS da estirpe selvagem, e não foi possível detectar EPS da estirpe EPSEB. Após 24 horas de crescimento, a precipitação do sobrenadante com etanol gelado resultou em um precipitado branco e um líquido de alta densidade para ambas as estirpes. O EPS precipitado foi obtido em concentrações em torno de 1,2 mg.mL<sup>-1</sup>, representando um rendimento de 1,2 µg de EPS por mg de fibra de vidro, e as amostras de alta densidade continham cerca de 0,2 mg.mL<sup>-1</sup> (rendimento de 0,2 µg.mL<sup>-1</sup>).

As amostras foram então analisadas por SDS-PAGE 12% (Fig. 23). O EPS da estirpe selvagem de 12h apresentou três bandas não definidas de diferentes razões massa/carga, e uma modificação deste padrão foi observada no EPS de 24h. A estirpe *epsB* apresentou EPS apenas na amostra de 24h, porém este EPS não formou bandas no SDS-PAGE, sugerindo uma carga reduzida da molécula. O líquido de alta densidade recuperado de ambas amostras de 24h não mostrou diferenças no padrão eletroforético, e portanto não foram utilizadas nos ensaios subsequentes. Não há na literatura análises de EPS por SDS-PAGE, uma vez que geralmente estes polissacarídeos são neutros, dificultando maiores discussões sobre este resultado. Muitas bactérias produzem mais de um tipo de EPS, os quais variam de composição e massa. Considerando que a biossíntese de EPS em *H. seropedicae* ocorra segundo o modelo de polimerização de unidades básicas, a mutação em *epsB* (que codifica para uma glucosiltransferase) não impediria a polimerização do EPS. Esta mutação

alteraria a formação das unidades básicas, fato que poderia ser contornado utilizando outros monossacarídeos como substrato (e outras glucosiltransferases).

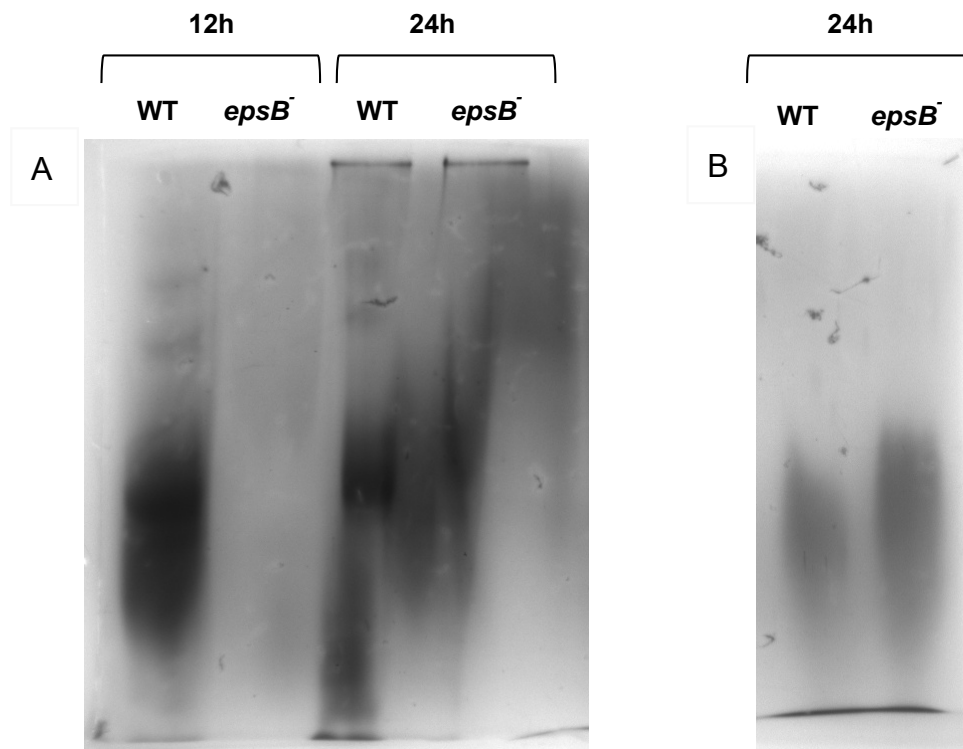


FIGURA 23 - PERFIL ELETROFORÉTICO DO EPS DAS ESTIRPES DE *H. seropedicae*. SDS-PAGE foi realizado com o EPS total extraído da estirpe selvagem (WT) e da estirpe mutante *epsB*<sup>-</sup> por precipitação do sobrenadante das culturas crescidas na presença de lã de vidro. (A): EPS precipitado. (B): EPS líquido de alta densidade.

#### 6.11. EPS DE *H. seropedicae* É NECESSÁRIO PARA FORMAÇÃO DE BIOFILME EM LÃ DE VIDRO

Uma das funções propostas para os EPS produzidos por bactérias é possibilitar a formação de agregados celulares altamente organizados denominados de biofilmes

(COSTERTON *et al.*, 1995). Para avaliar esta função do EPS de *H. seropedicae*, as estirpes selvagem e mutante *epsB* foram cultivadas na presença de lã de vidro como substrato sólido. A formação do biofilme foi avaliada quantitativamente por coloração das bactérias aderidas à lã de vidro (Fig. 24), e qualitativamente por microscopia ótica (Fig. 25).

Após doze horas de crescimento na presença de lã de vidro, a estirpe EPSEB mostrou uma redução de 45% na formação de biofilme quando comparada à estirpe selvagem. Observações microscópicas mostraram que a estirpe mutante não forma biofilmes estruturados, apresentando apenas poucas células aderidas. Este fenótipo foi parcialmente restaurado pela adição de EPS selvagem purificado, sugerindo que este polissacarídeo é necessário para a formação de biofilme. Vinte e quatro horas após inoculação, a formação de biofilme da estirpe EPSEB foi similar ao da estirpe selvagem, mostrando que a mutação em *epsB* apenas atrasou a formação de biofilme pela redução da biosíntese de EPS.

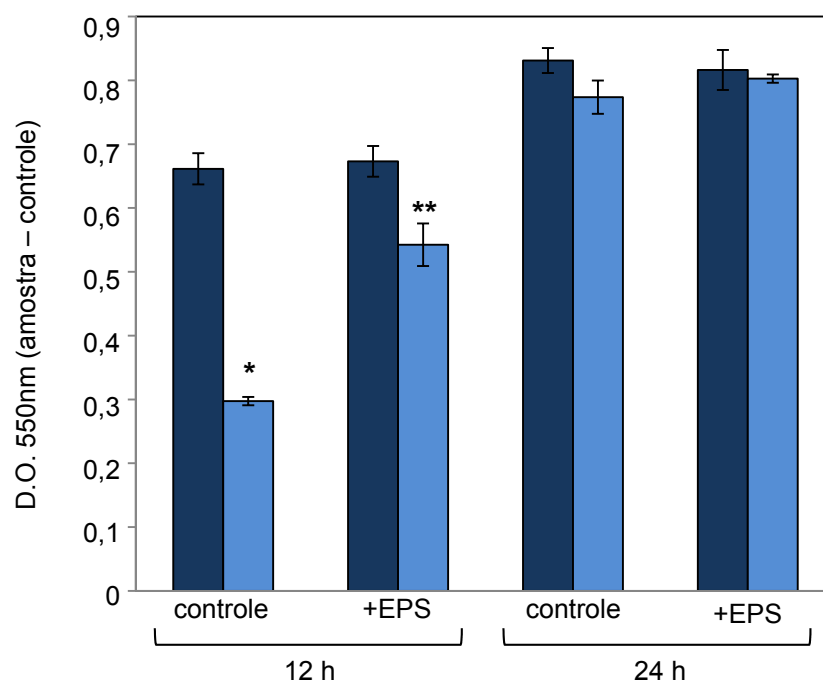


FIGURA 24 - EPS DE *H. seropedicae* É NECESSÁRIO PARA FORMAÇÃO DE BIOFILME EM FIBRA DE VIDRO. *H. seropedicae* selvagem (barras azul escuro) e mutante EPSEB (barras azul claro) foram crescidas na presença de lã de vidro e EPS purificado da estirpe selvagem (100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) quando indicado. Após 12 ou 24 horas, a matriz foi removida, e as bactérias aderidas a ela coradas com violeta cristal. A amostra foi então descorada com etanol absoluto e a absorbância deste mensurada a 550nm. Valores expressos como  $\text{DO}_{550}$  das amostras subtraída da  $\text{DO}_{550}$  de uma matriz de fibra de vidro corada sem bactérias. Asteriscos indicam diferença significativa ( $p < 0,001$ , teste *t* de Student) entre a formação de biofilme da estirpe selvagem e mutante,  $n=15$  culturas por condição.

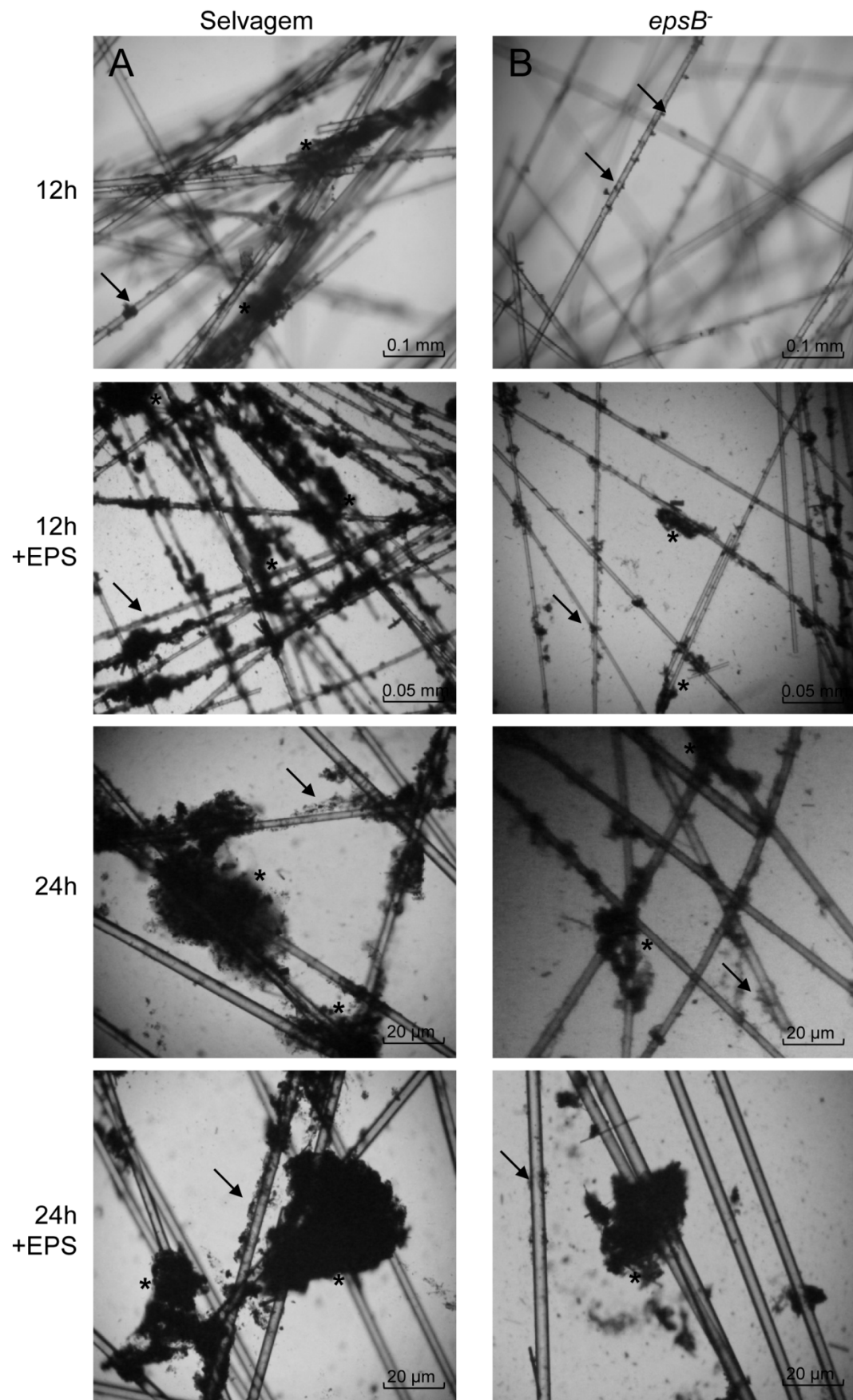


FIGURA 25 – FORMAÇÃO DE BIOFILME EM FIBRA DE VIDRO POR *H. seropedicae*. Alíquotas da fibra de vidro corada após crescimento bacteriano foram analisadas por microscopia ótica. (A): *H. seropedicae* SMR1; (B) *H. seropedicae* EBEPs. Setas indicam bactérias aderidas às fibras; asteriscos indicam unidades de biofilme, n=4 lâminas por condição.

O estudo da interação destas estirpes com o hospedeiro vegetal permitirá determinar se a formação de biofilme é necessária para a colonização de plantas por *H. seropedicae*.

#### 6.12. A COLONIZAÇÃO DE MILHO POR *H. seropedicae* NÃO É DEPENDENTE DA PRODUÇÃO DE EPS

A colonização das estirpes selvagem e mutante EPSEB em milho foi acompanhada para avaliar a função do EPS bacteriano neste processo. O perfil de colonização da estirpe EPSEB foi muito similar ao da estirpe selvagem (Fig. 26), sugerindo que a adesão, colonização epifítica e endofítica não dependem da produção de EPS. O uso de doses menores de bactérias para inoculação, ou co-inoculação da estirpe selvagem e mutante em ensaios de adesão não mostraram diferenças na colonização entre as estirpes (Fig. 27).

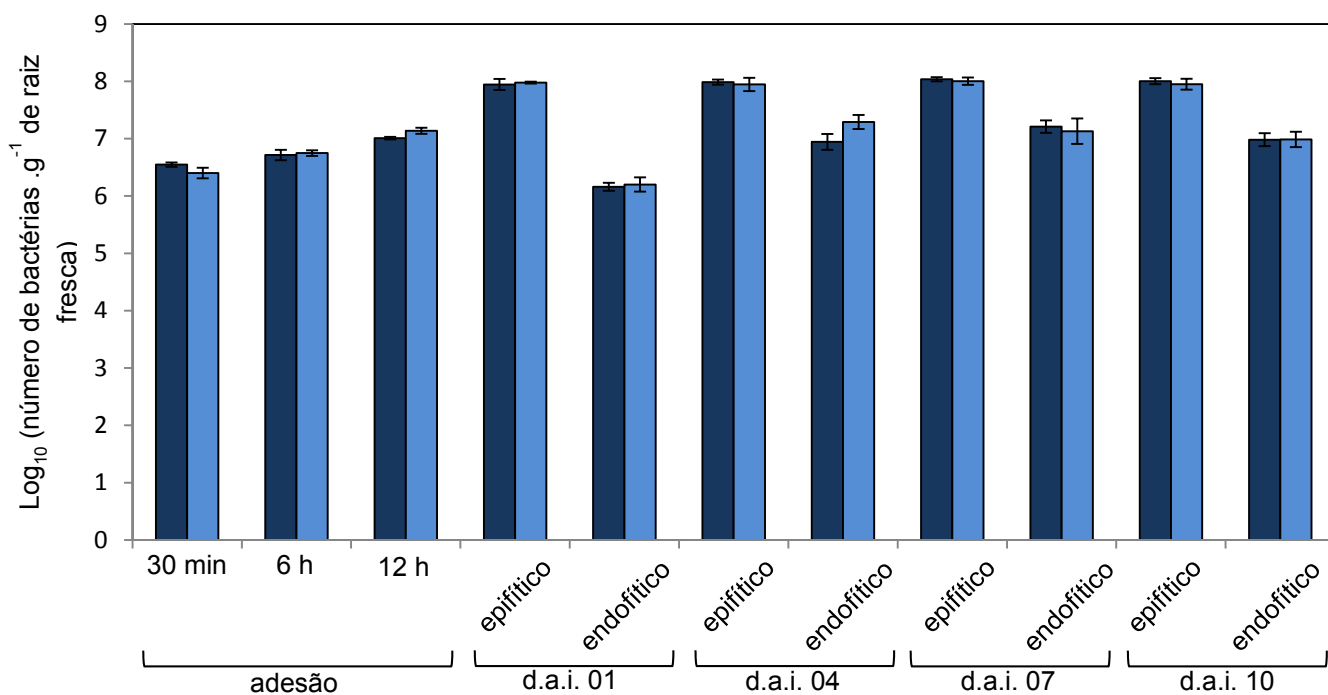


FIGURA 26 - COLONIZAÇÃO DE RAÍZES DE MILHO PELAS ESTIRPES SELVAGEM (barras azul escuro) E MUTANTE *epsB* (barras azul claro) de *H. seropedicae*. Plântulas de milho foram inoculadas com 10<sup>5</sup> células das estirpes de *H. seropedicae*, e o número de bactérias aderidas à raiz após lavagem foi determinado 30 min, 6h e 12h após inoculação. O número de células epifíticas e endofíticas foi determinado 1, 4, 7 e 10 dias após inoculação (d.a.i.). Resultados mostrados como média do Log<sub>10</sub> (número de bactérias.g<sup>-1</sup> de raiz) ± desvio padrão, n=9 plantas por dia por condição.

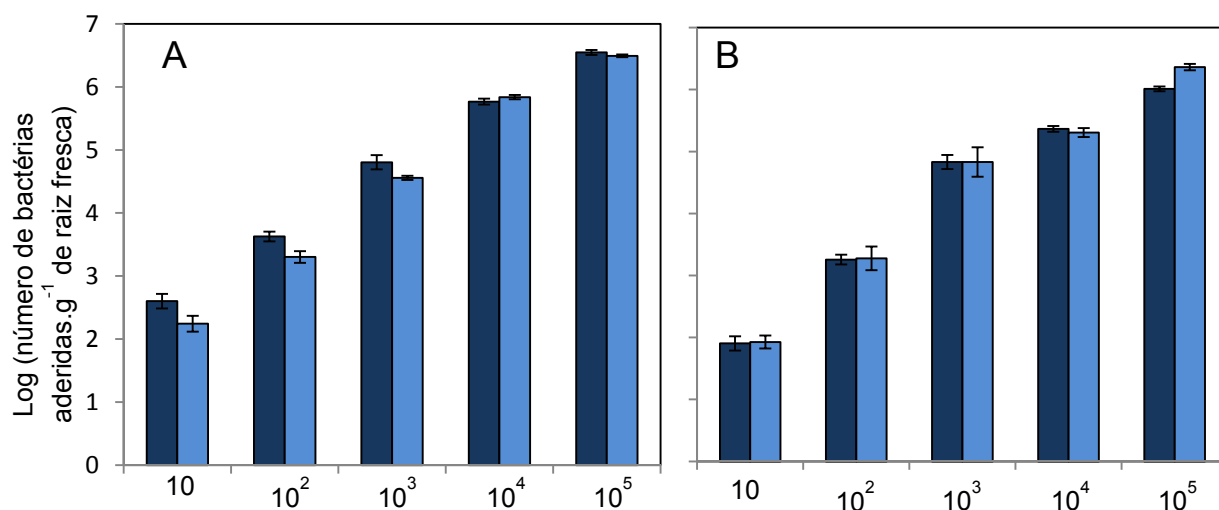


FIGURA 27 – DIMINUIÇÃO DA PRODUÇÃO DE EPS POR *H. seropedicae* NÃO ALTERA A CAPACIDADE DE ADESÃO EM RAÍZES DE MILHO. *H. seropedicae* selvagem (barras azul escuro) e mutante *epsB* (barras azul claro) foram inoculados em milho separadamente (A) ou co-inoculados em proporção de 1:1 (B), com total de bactérias indicado no eixo x. Resultados mostrados como média do Log<sub>10</sub> (número de bactérias aderidas.g<sup>-1</sup> de raiz) ± desvio padrão, n=6 plantas por dia por condição.

### 6.13. A EXPRESSÃO DOS GENES *eps* DE *H. seropedicae* É REPRIMIDA DURANTE COLONIZAÇÃO DE MILHO E INDUZIDA DURANTE ADESÃO À FIBRA DE VIDRO

Tadra-Sfeir e colaboradores (2011) mostraram por RT-PCR que a expressão dos genes *epsB* e *epsG* (que codifica para outra glucosiltransferase) é reprimida pela presença do flavonóide naringenina. A estirpe contendo a fusão cromossomal *epsG::lacZ* usada por Tadra-Sfeir e colaboradores (2011) foi utilizada para determinar



a regulação da expressão do operon *epsLBDAFG* durante colonização da rizosfera e durante formação de biofilme em lâ de vidro (Fig. 28).

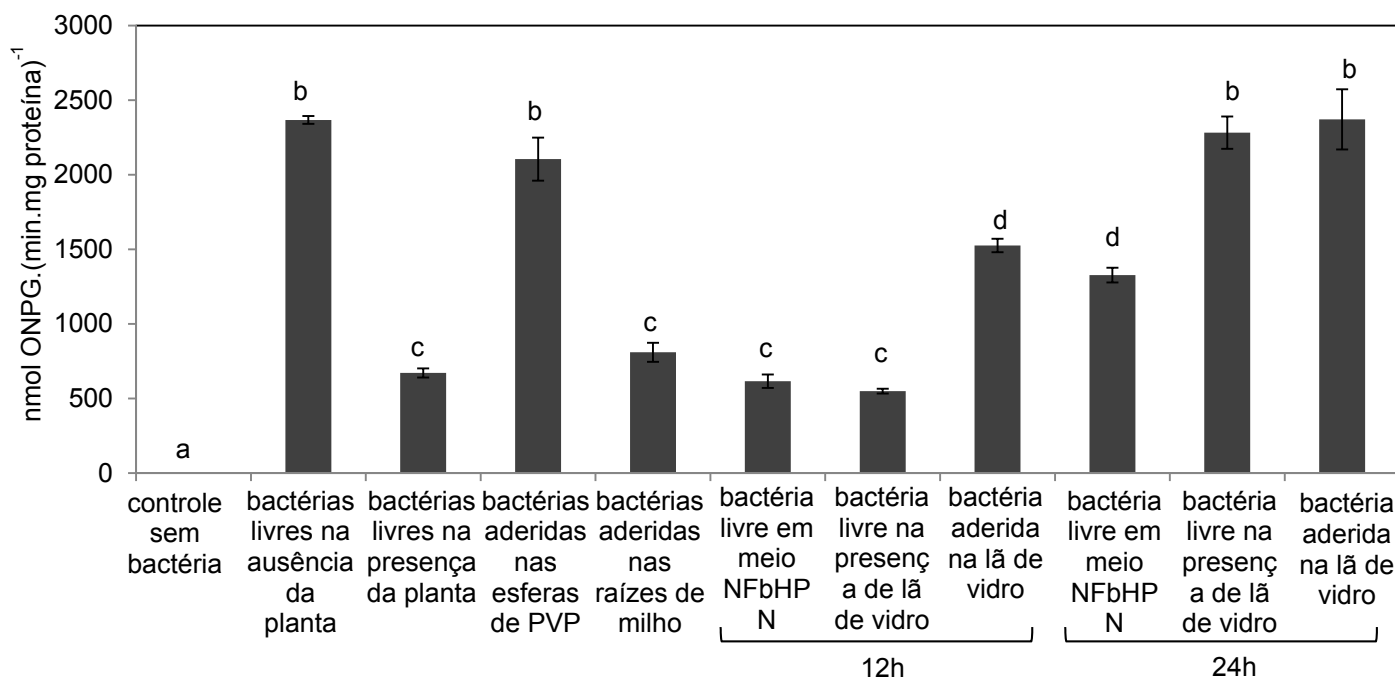


FIGURA 28 – REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE *epsG* DE *H. seropedicae* DURANTE COLONIZAÇÃO DO RIZOPLANO E FORMAÇÃO DE BIOFILME. Para as análises de expressão durante interação com milho,  $10^8$  UFC de *H. seropedicae* MHS1 (*epsG::lacZ*) foram inoculadas em sistema hidropônico. Após 24 horas, as células do meio hidropônico foram concentradas por centrifugação. As células aderidas às raízes ou às esferas de polipropileno (controle de adesão sem planta) foram retiradas por vórtex e concentradas por centrifugação. Para as análises de expressão em biofilme, *H. seropedicae* MHS1 foi crescido na presença e ausência de lâ de vidro. Bactérias livres foram diretamente usadas e bactérias em biofilme foram recuperadas por vórtex. Para todas as amostras a atividade de  $\beta$ -galactosidase foi determinada e padronizada pela concentração de proteína total. Valores expressos em  $\text{nmol ONPG} \cdot (\text{min} \cdot \text{mg de proteína})^{-1} \pm$  desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas com  $p < 0,01$  (teste múltiplo de Duncan),  $n=9$  culturas por condição.

A biossíntese de EPS é reprimida durante os primeiros passos da interação com o hospedeiro. Esta repressão foi observada em ambas populações bacterianas de vida livre (que crescem no meio hidropônico na presença da planta) e população aderida à raiz, sugerindo que o EPS de *H. seropedicae* não participa do passo de adesão da colonização. Por outro lado, a biossíntese de EPS é induzida pela presença de uma matriz inerte. Após 12 horas de crescimento, a expressão do operon *epsLBDAFG* pelas células aderidas na lã de vidro foi cerca de três vezes maior que nas células de vida livre. Depois de 24 horas, a presença das esferas de PVP no sistema hidropônico ou de lã de vidro no meio mínimo aumentou cerca de duas vezes a expressão do operon *epsLBDAFG*, tanto nas células aderidas aos substratos como nas células livres vizinhas.

#### 6.14. PAPEL DO EPS DE *H. seropedicae* NA INTERAÇÃO COM HOSPEDEIRO

Exopolissacarídeos têm sido descritos como fatores importantes que possibilitam agregação celular e formação de biofilme em superfícies sólidas. Como mostrado para outras bactérias associativas de plantas (BURDMAN *et al.*, 2000; STEENHOUDT e VANDERLEYDEN, 2000, MENESES *et al.*, 2011), a mutação de genes envolvidos na biossíntese de EPS em *H. seropedicae* altera a produção de EPS e consequentemente a formação de biofilme, mas controversalmente não modifica o perfil de colonização do hospedeiro vegetal.

O nocaute de *epsB* em *H. seropedicae* reduziu aproximadamente pela metade a produção de EPS em 12 horas. Uma redução proporcional foi observada na capacidade inicial de formação de biofilme da estirpe mutante EPSEB comparada a estirpe selvagem. Esta capacidade foi parcialmente restaurada pela adição de EPS purificado, sugerindo uma função direta do EPS na estrutura do biofilme. Um período mais longo de incubação mostrou que a estirpe mutante alcançou o mesmo nível de formação de biofilme do que a estirpe selvagem, sugerindo que o EPS eletroforéticamente diferente produzido por EPSEB ainda é útil para formação de biofilme. A importância do EPS na formação de biofilme foi demonstrada pela indução dos genes *eps* na presença de substratos inertes como lã de vidro e esferas de polipropileno.

Apesar do envolvimento do EPS de *H. seropedicae* na adesão a superfícies sólidas, não foram observadas diferenças entre a estirpe selvagem e mutante na capacidade de colonização de milho. Inclusive quando doses menores de bactérias foram utilizadas para inocular as plantas, a adesão da estirpe mutante foi similar a da selvagem. O aumento e manutenção da população epifítica parecem ser independentes da produção de EPS. É válido mencionar que esta bactéria poderia produzir algum tipo alternativo de EPS com função na adesão à planta, mas nenhum agrupamento gênico secundário de *eps* foi identificado.

A função clássica descrita para o EPS como molécula de adesão de rizobactérias à planta parece ser preenchido em *H. seropedicae* pelo LPS. Análises de microscopia eletrônica de varredura mostraram que *H. seropedicae* forma um

biofilme de monocamada na superfície radicular de milho (RONCATO-MACCARI *et al.*, 2003), não desenvolvendo biofilmes maduros como observado em lã de vidro. Como a transição de uma interação fraca da célula com o substrato para uma adesão permanente é geralmente requerida para o crescimento e maturação do biofilme (STOODLEY *et al.*, 2002), *H. seropedicae* parece parar o desenvolvimento do biofilme na raiz ao não produzir EPS. Uma vez que estas bactérias aderidas são capazes de penetrar os tecidos internos e os colonizar, ao evitar a adesão permanente e maturação do biofilme *H. seropedicae* poderia continuar disponível para buscar locais de penetração e fontes de nutrientes na rizosfera.

Nas bactérias que interagem com plantas com função para o EPS já descrita, incluindo associativas, simbióticas ou patogênicas, quando o EPS está envolvido na formação de biofilme ele também é requerido para colonização da planta ou atua como fator de virulência (GONZÁLEZ *et al.*, 1996; ROLFE *et al.*, 1996; CHAPMAN & KAO, 1998; CHENG & WALKER, 1998; VAN WORKUM *et al.*, 1998; FUJISHIGE *et al.*, 2006; KOUTSOUDIS *et al.*, 2006; ROPER *et al.*, 2007; TORRES *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2008; KOCZAN *et al.*, 2009; PÉREZ-GIMÉNEZ *et al.*, 2009; RINAUDI & GONZÁLEZ, 2009; JANCZAREK *et al.*, 2010; TOMLINSON *et al.*, 2010; MENESES *et al.*, 2011). *H. seropedicae* SmR1 parece ser o primeiro caso descrito de repressão da biossíntese de EPS durante colonização da planta.

## 6.15. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA EXTERNA DE *H. seropedicae*

Visando identificar a presença de proteínas de membrana externa de *H. seropedicae* com provável função de adesinas, proteínas totais de membrana externa foram isoladas de células de *H. seropedicae* crescidas em meio NFbHPN for ultracentrifugação após tratamento com sarcosil. Os extratos proteicos foram analisados por eletroforese em gradiente de acrilamida (SDS-PAGE 7-20%)(Fig. 29).

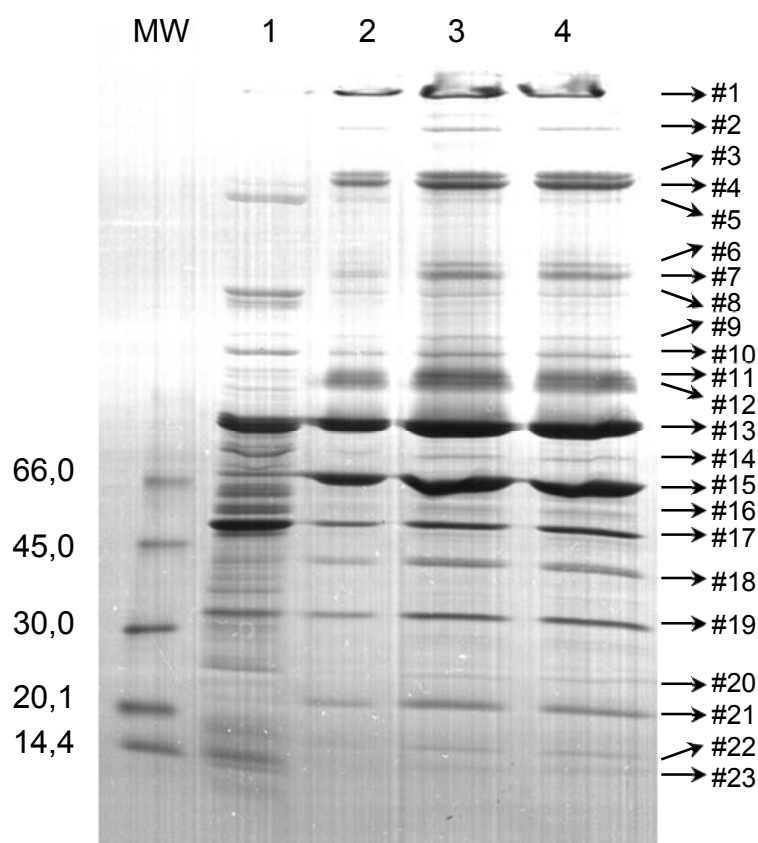


FIGURA 29 – ELETROFORESE DAS FRAÇÕES DE MEMBRANA DE *H. seropedicae* POR SDS-PAGE 7-20%. Proteínas de membrana externa foram purificadas por ultracentrifugação após tratamento com sarcosil do extrato de proteínas totais de membrana. Linhas: MW – marcadores de massa molecular (em kDa); 1: extrato total de proteínas de membrana; 2, 3 e 4: replicatas biológicas da fração de

proteínas de membrana externa. Setas indicam as bandas analisadas por espectroscopia de massa.

As proteínas foram coradas com Coomassie blue.

As 23 bandas proteicas foram excisadas do gel e os fragmentos tripticos analisados por MALDI-TOF (Tabela 6).

TABELA 6 – IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS DE MEMBRANA EXTERNA DE *H. seropedicae* POR ESPECTROSCOPIA MALDI-TOF.

Número da banda	Score	Identificação
#2	111	<i>Hsero_4295</i> : proteína de membrana externa (porina)
#4	123	<i>Hsero_4295</i> : proteína de membrana externa (porina)
#5	124	<i>Hsero_4295</i> : proteína de membrana externa (porina)
#6	156	<i>Hsero_4295</i> : proteína de membrana externa (porina)
#7	149	<i>Hsero_4295</i> : proteína de membrana externa (porina)
#9	156	<i>Hsero_4295</i> : proteína de membrana externa (porina)
#12	120	<i>Hsero_4295</i> : proteína de membrana externa (porina)
#13	190	<i>glnA</i> : glutamina sintetase
#15	162	<i>fliC</i> : flagelina
#16	182	<i>Hsero_4295</i> : proteína de membrana externa (porina)

As comparações de massa dos peptídeos ao banco de dados e respectivo score foram obtidos utilizando o programa MASCOT.

Apenas 10 das 23 bandas proteicas foram identificadas com score aceitável. Destas, oito foram identificadas como uma porina codificada pelo gene *Hsero\_4295*. Uma vez que proteínas denominadas porinas apresentam alta homologia entre si, a

análise de PMF utilizada pode não ser precisa o suficiente para indicar o gene codificador de cada porina. Assim, uma alternativa que resolveria este problema, assim como possibilitaria identificar outras proteínas de baixa concentração não visíveis no gel, seria analisar o extrato de proteínas de membrana externa por cromatografia líquida acoplada à espectroscopia de massa de segunda dimensão.

A flagelina (FliC), constituinte do filamento flagelar, é descrita como um importante fator na determinação de compatibilidade entre plantas e fitopatógenos (ICHINOSE *et al.*, 2003). Ela é responsável por elicitar resposta de hipersensibilidade nos hospedeiros de *P. syringae* pv. *tabaci* (FELIX *et al.*, 1999; TAGUCHI *et al.*, 2003), and *P. syringae* pvs. *tomato* e *glycinea* (TAGUCHI *et al.*, 2003). Um epítipo de 22 aminoácidos da flagelina é reconhecido por receptores quinases ricos em leucina (LRR) de várias plantas (FELIX *et al.*, 1999; GOMEZ-GOMEZ & BOLER, 2002), ativando respostas múltiplas de defesa, incluindo apoptose (NAVARRO *et al.*, 2004). Plantas que não apresentam este receptor são mais suscetíveis à infecção por *Pseudomonas* quando o patógeno é pulverizado nas folhas, mas não quando é infiltrado no apoplasto, sugerindo que atua nos estágios iniciais da interação (ZIPFEL *et al.*, 2004). A flagelina de *A. brasilense* é uma glicoproteína envolvida na adesão à raiz de trigo, agindo diretamente como adesina (CROES *et al.*, 1993). Mutantes flagelares de *S. meliloti* apresentaram biofilmes menos desenvolvidos e um atraso na formação de nódulos (FUJISHIGE *et al.*, 2006). Assim, motilidade e quimiotaxia também interferem na colonização de raízes por bactérias. Elas podem mover-se por diferentes mecanismos, incluindo natação flagelar, contração, vibração e

deslizamento. A motilidade flagelar provavelmente provê acesso a pontos de adesão na planta, possibilitando além da adesão inicial a maturação do biofilme (DANHORN & FUQUA, 2007). *H. seropedicae* apresenta de 1 a 3 flagelos polares (BALDANI *et al.*, 1986), assim, a caracterização de estirpes mutantes para este aparato deve permitir determinar a função destes flagelos durante colonização dos hospedeiros.

A glutamina sintetase (GlnA), apesar de ser uma proteína citoplasmática, foi encontrada em diversas bactérias em frações de membrana purificadas de diferentes métodos (BAIK *et al.*, 2004; CASH, 2006), sugerindo que *H. seropedicae* também exporta esta proteína para a membrana externa. Essa proteína é responsável pela condensação de glutamato e amônia em glutamina, papel central no metabolismo de nitrogênio. Em micobactérias, a presença desta proteína na membrana externa e também como proteína secretada parece ser restrita às espécies patogênicas, sugerindo seu envolvimento na patogenicidade (RAYNAUD *et al.*, 1998).

#### 6.16. PERFIL TRANSCRIPTÔMICO DE *H. seropedicae* DURANTE COLONIZAÇÃO DA RIZOSFERA

Visando identificar o padrão de expressão gênica de *H. seropedicae* durante os estágios iniciais de colonização da rizosfera, foi realizada uma análise transcriptômica desta bactéria durante interação com milho. A inoculação de *H. seropedicae* em milho sob condições de laboratório mostrou que em três dias a população epifítica bacteriana alcançou o número máximo de células por grama de



raiz (perfil da estirpe selvagem na Figura 11). Assim, os fatores moleculares necessários para colonização epifítica teriam sido provavelmente expressos. Desta forma, foram escolhidos dois pontos para a análise transcriptômica: 1 d.a.i. e 3 d.a.i., o que permite seguir a evolução da colonização da raiz. Nestes dois pontos de análise foram utilizadas bactérias recuperadas do meio líquido do sistema hidropônico (denominadas plantônicas), e bactérias recuperadas da superfície radicular (aderidas). A condição de bactérias aderidas foi denominada “A” e a condição de bactérias plantônicas “P”, ambas seguidas pelo relativo tempo de inoculação “1” para amostras 1 d.a.i. e “3” para amostras de 3 d.a.i. O mapeamento das quatro amostras usando o genoma de milho como referência revelou que menos de 0,001% do total de leituras eram derivados de contaminação por material vegetal. O mapeamento contra o genoma de *H. seropedicae* SmR1 foi realizado excluindo as leituras mapeadas em genes para tRNA e rRNA remanescentes, uma vez que eles compuseram cerca de 80% do total de leituras e são pouco informativos. Os dados remanescentes (Tabela 7) foram usados para comparar amostras aderidas e plantônicas entre si e com uma condição de bactérias crescidas em meio NFbHPN (dados de TADRA-SFEIR et al., não publicados).

TABELA 7 – DADOS DA ANÁLISE TRANSCRIPTÔMICA.

Amostras	Total de leituras	Leituras mapeadas não-ambíguas	Genes expressos (pelo menos 3 vezes de cobertura)
P1	21.422.684	1.110.612	1467
P3	20.702.790	1.329.862	1370
A1	30.169.957	403.465	823
A3	22.091.857	1.145.546	1165

Dados referentes à somatória dos valores das duas replicatas biológicas.

#### 6.16.1. Balanço de nitrogênio durante interação com a planta

Os genes que apresentaram uma maior alteração na expressão quando as células de *H. seropedicae* estavam na presença do hospedeiro (ambas as amostras aderidas e plantônicas comparadas com bactérias em meio mínimo) foram relacionados com metabolismo de nitrogênio (ANEXO 06).

Sob condições de limitação de nitrogênio, como durante colonização da planta (Fig. 30), o sensor proteico NtrB ativa NtrC por fosforilação (PERSUHN *et al.*, 2000). NtrC ativado age como ativador transcricional de promotores de genes relacionados ao metabolismo de nitrogênio (CHUBATSU *et al.*, 2011). Os cinco principais operons dependentes de NtrC- $\sigma^{54}$  ativados (nesta análise transcriptômica) contêm genes que codificam para transportadores de nitrato, nitrito, amônia e uréia, ativador transcricional NifA, nitrato e nitrito redutases assimilatórias e a proteína PII GlnK (PERSUHN *et al.*, 2000, WASSEM *et al.*, 2002, NOINDORF *et al.*, 2006, SCHWAB *et al.*, 2007). A proteína GlnD (PII uridililtransferase), que apresenta níveis de expressão

similares na rizosfera comparado ao meio mínimo, ativa GlnK por uridililação em resposta ao níveis de ATP, 2-oxoglutarato e glutamina (CHUBATSU *et al.*, 2011, BONATTO *et al.*, 2012). A GlnK-UMP liga à NifA, e este complexo proteico ativa a expressão dos genes de fixação de nitrogênio (OLIVEIRA *et al.*, 2012). Os genes *nif* de *H. seropedicae* compreendem um agrupamento de 38 Kb organizado em sete operons NifA- $\sigma^{54}$ -dependentes, os quais apresentam todos os genes necessários para síntese e atividade da nitrogenase, incluindo importação de molibdênio, transporte de elétrons e síntese dos grupos metálicos (CHUBATSU *et al.*, 2011). Além da expressão observada dos genes *nif* na rizosfera de milho, o complexo da nitrogenase de *H. seropedicae* é expresso quando a bactéria coloniza endofiticamente raízes, colmos e folhas de arroz, sorgo, milho e trigo (JAMES *et al.*, 2002, RONCATO-MACCARI *et al.*, 2003). A amônia produzida pela nitrogenase do  $N_2$  pode ser exportada pelo transportador AmtBNImA, incorporado em aminoácidos por GS ou transformado em uréia, uma forma menos reativa. A uréia pode ser exportada pelo transportador UrtABCDE ou reconstituir amônia pela ação da amônia amidoliase. A expressão dos genes de transporte de uréia, como observado por Schwab e colaboradores (2007) sob condições de limitação de nitrogênio, são provavelmente controlados pelo sistema Nrt, uma vez que um promotor NtrC- $\sigma^{54}$ -dependente está localizado a montante de *urtA*.



o efluxo de nitrato vegetal pode ser maior que o influxo (PAN, JACKSON e MOLL., 1985, SEGONZAC *et al.*, 2007). O pH medido do meio hidropônico em 1 d.ai. foi 6,4, e o pH do meio fresco é 6,9. Uma acidificação similar (pH 6,3) foi observada no meio contendo plantas não-inoculadas, sugerindo que exsudatos vegetais (provavelmente ácidos orgânicos) são responsáveis pelo deslocamento do pH. Em 1 d.a.i., a concentração determinada de nitrato/nitrito no meio hidropônico foi  $0.335 \pm 0.005$  mM (independentemente da presença bacteriana). Em 3 d.a.i., a concentração de nitrato/nitrito aumentou para  $0.526 \pm 0.012$  mM na ausência da bactéria, e manteve-se  $0.369 \pm 0.034$  mM na presença da bactéria. *H. seropedicae* parece assimilar uma porção do nitrato livre, balanceando seu estoque de amônia. A intensa expressão observada dos transportadores de amônia, uréia e nitrito devem permitir o enriquecimento de nitrogênio do meio e a nutrição vegetal.

Esta rede de regulação do metabolismo de nitrogênio foi observada nos dados transcriptômicos das bactérias aderidas 1 d.a.i. e de ambas amostras plantônicas (ANEXO 06), e confirmada por ensaios de  $\beta$ -galactosidase (Fig. 31).

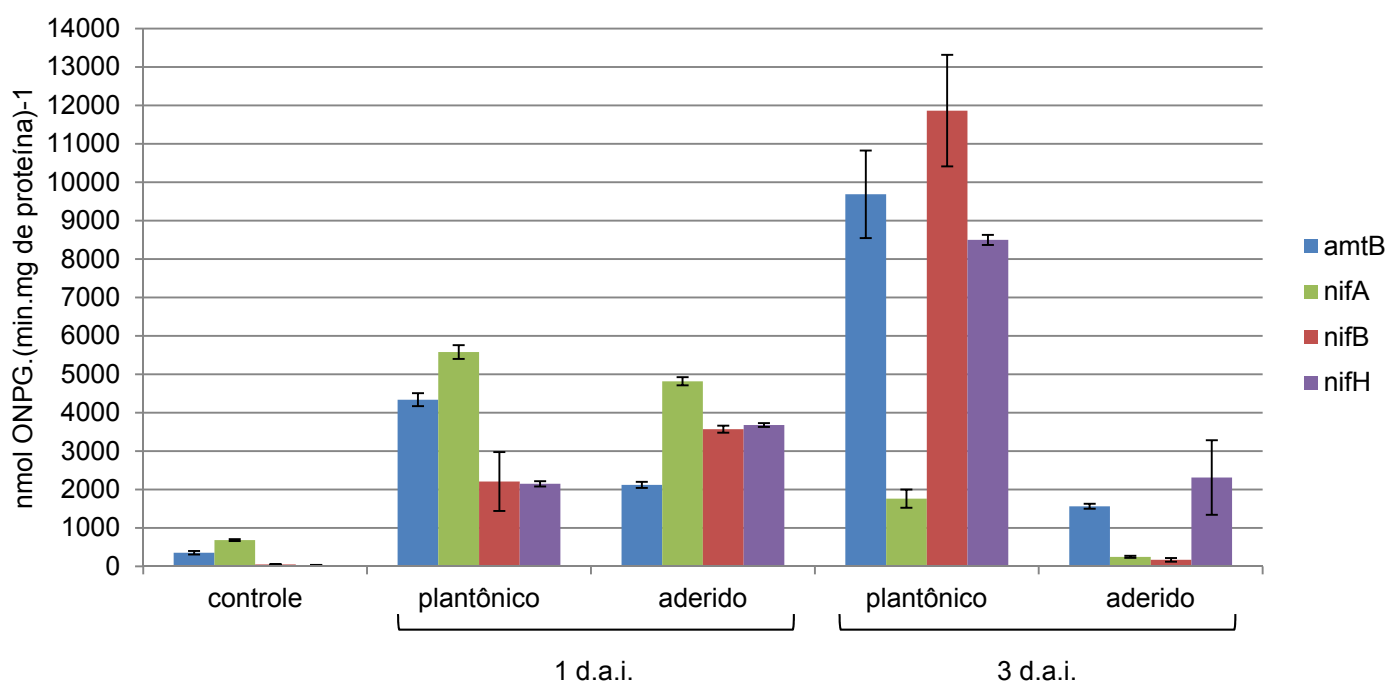


FIGURA 31 – REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES DE METABOLISMO DE NITROGÊNIO DE *H. seropedicae* NA RIZOSFERA.  $10^8$  UFC de *H. seropedicae* com as fusões *amtB::lacZ*, *nifA::lacZ*, *nifB::lacZ* ou *nifH::lacZ* foram inoculadas em sistema hidropônico. Após 1 ou 3 dias, as células do meio hidropônico foram concentradas por centrifugação e então sua atividade de  $\beta$ -galactosidade foi determinada e padronizada pela concentração de proteína total. As células aderidas às raízes foram retiradas por vórtex, concentradas por centrifugação e então a atividade específica foi determinada. Valores expressos em nmol ONP.(min.mg de proteína)<sup>-1</sup>  $\pm$  desvio padrão.

#### 6.16.2. Uso de PHB para sobrevivência na rizosfera no início da colonização

*H. seropedicae* sintetiza poli(3-hidroxibutirato) e o armazena intracelularmente como corpos de inclusão insolúveis denominados grânulos de PHB (CATALAN *et al.*, 1997; KADOWAKI *et al.*, 2011). O PHB é sintetizado pela condensação de duas acetil-CoA rendendo acetoacetil-CoA (catalisado pela 3-cetotiolase codificada por *phbA*), seguido pela redução de acetoacetil-CoA para (R)-3-hidroxibutiril-CoA (pela acetoacetil-CoA redutase NADPH-dependente codificada por *phbB*) e finalmente pela polimerização de (R)-3-hidroxibutiril-CoA para poli(3-hidroxibutirato) (pela PHB sintase codificada por *phbC*). Uma depolimerase ligada à membrana do grânulo (codificada por *phbZ*) degrada o PHB a 3-hidroxibutirato, que é então processado para produzir dois acetil-CoA, entrando no ciclo tricarboxílico. A habilidade de produzir e armazenar PHB tem sido correlacionada com a melhoria da sobrevivência em condições de estresse e em ambientes competitivos (KADHOURI *et al.*, 2003; RATCLIFF e DENISON, 2011). Na rizosfera, uma fonte de carbono pode ser importante para a sobrevivência bacteriana até o estabelecimento da associação com a planta, e também representar uma vantagem competitiva durante a colonização.

Crescendo em meio NfbHPN com malato como única fonte de carbono, *H. seropedicae* expressa os genes *phbABC* e produz PHB (KADOWAKI *et al.*, 2011). Uma vez que estas bactérias são inoculadas na planta, um dia após inoculação a expressão destes genes diminuiu de 3 a 9 vezes, provavelmente devido ao meio ambiente pobre nutricionalmente (Fig. 32). Além disso, a expressão da PHB depolimerase (*phaZ2*)

aumentou 12 a 16 vezes, sugerindo que a bactéria está mobilizando seu estoque de PHB para sobrevivência. O gene *phaZ1* não apresentou o mesmo aumento de expressão nestas condições. O perfil de expressão de *phaZ2* sugere que este gene é reprimido na presença de uma fonte externa de carbono, entretanto quando a bactéria defronta-se com um meio com carbono limitado como a solução hidropônica ou a superfície radicular e expressão de *phaZ2* é desreprimida. Um perfil similar de expressão já foi reportado para a PHA depolimerase de *Paucimonas leimognei* (TERPE *et al.*, 1999).

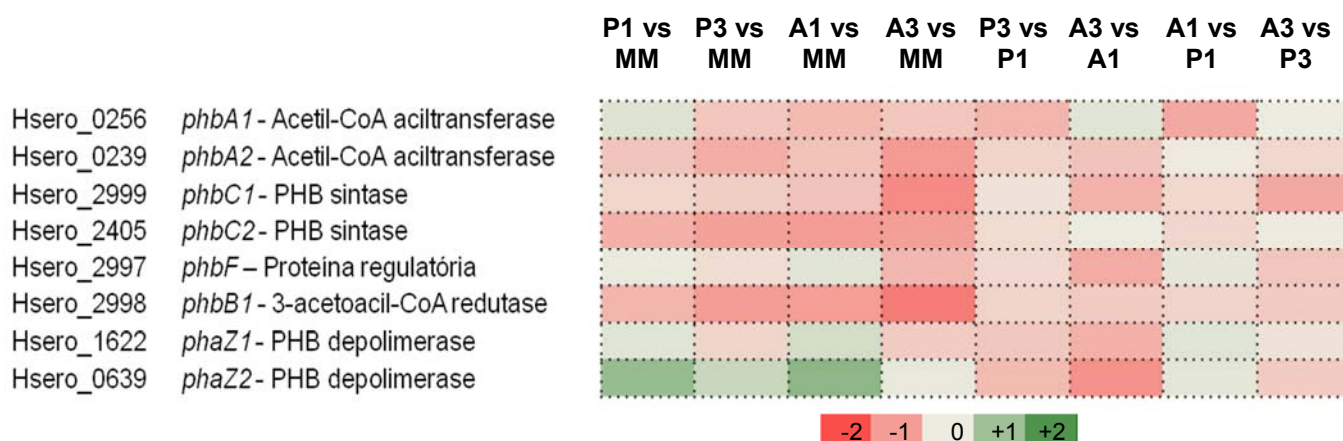


FIGURA 32 – DEGRADAÇÃO DE PHB POR *H. seropedicae* NA RIZOSFERA. Mapa de calor representa o Log do módulo da diferença de expressão. P1: células plantônicas 1 d.a.i. P3: células plantônicas 3 d.a.i. A1: células aderidas 1 d.a.i. A3: células aderidas 3 d.a.i. MM: células crescidas em meio NFbHPN.



Para avaliar a importância da mobilização de PHB durante a colonização da planta, foi determinado o perfil de colonização de raiz de milho por *H. seropedicae* SmR1 e a mutante  $\Delta phbC$  (Fig. 33), a qual não produz PHB (TIRAPELLE *et al.*, 2013). A capacidade de adesão da estirpe mutante não foi alterada quando comparada a da estirpe selvagem. Por outro lado, 1 d.a.i. o número de células plantônicas e epifíticas do mutante  $\Delta phbC$  foi 10 vezes menor que o de selvagens, sugerindo que a ausência da mobilização de PHB afeta negativamente a associação nos estágios iniciais da colonização da planta. Três d.a.i., não foi observado diferenças significativas entre a colonização das estirpes selvagem e  $\Delta phbC$ , corroborando com a expressão não-diferencial dos genes *phb*. Estes resultados indicam o consumo do estoque de PHB até o terceiro dia da associação. A mobilização de PHB possivelmente ocorre durante o estabelecimento bacteriano no tecido vegetal e continua até o terceiro dia quando o consumo total do PHB é atingido e/ou a bactéria começa a captar fontes de carbono de origem vegetal. Ensaio de co-inoculação revelaram que a deficiência de produção de PHB do mutante  $\Delta phbC$  não alterou a capacidade competitiva para adesão, e teve apenas um leve efeito nas células plantônicas comparado ao experimento com inoculação separada. Interessantemente, 1 d.a.i o número de células epifíticas e endofíticas do mutante  $\Delta phbC$  foi 20 vezes menor que o de células selvagens co-inoculadas, e cerca de 10 vezes menor quando comparado ao experimento com inoculação separada. Três d.a.i. não foram observadas diferenças na colonização entre as estirpes, sugerindo uma vantagem competitiva para estirpes de *Herbaspirillum* produtoras de PHB apenas durante as etapas iniciais da colonização.

Esta vantagem pode ter consequências mais drásticas na natureza devido à competição com outros microrganismos e condições ambientais de estresse.

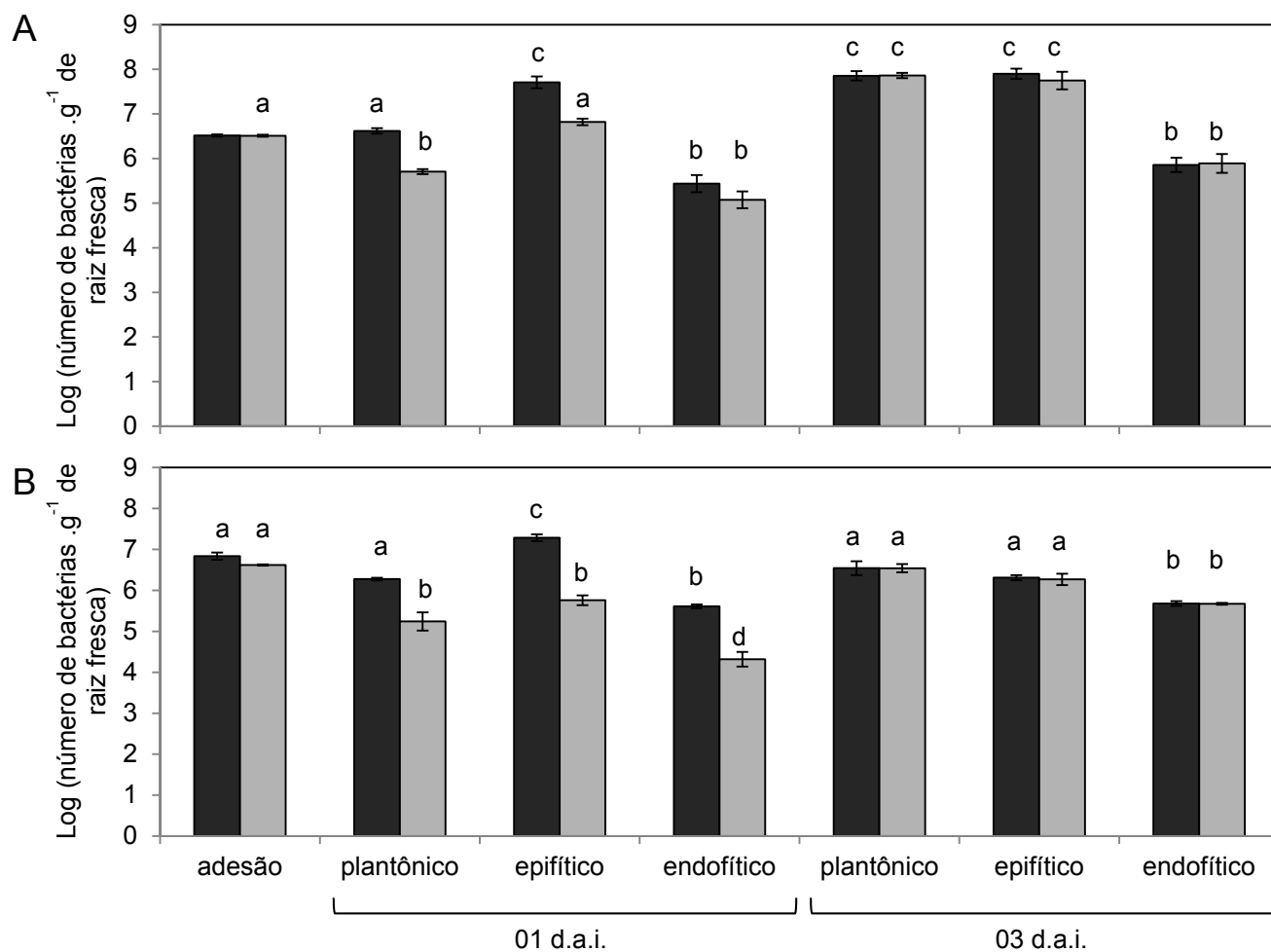


FIGURA 33 - COLONIZAÇÃO INICIAL E CAPACIDADE COMPETITIVA DE *H. seropedicae* DEPENDEM DO USO DE PHB. Plântulas de milho foram inoculadas com as estirpes selvagem (barras pretas) e mutante  $\Delta phbC1$  (barras cinzas) de *H. seropedicae* separadamente (A) ou co-inoculadas na proporção de 1:1 (B), com um total de  $10^5$  bactérias por planta. Resultados mostrados como média do  $\text{Log}_{10}$  (número de bactérias.g<sup>-1</sup> de raiz)  $\pm$  desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa com  $p < 0,01$  (teste múltiplo de Duncan).

### 6.16.3. Estrutura da cápsula é modificada durante interação com a planta

Vários genes relacionados ao transporte e biossíntese de polissacarídeos tiveram a sua expressão alterada na presença da planta. Embora não houve uma regulação clara das vias biossintéticas conhecidas, a diferença significativa na expressão deve causar rearranjos e modificações químicas nos polissacarídeos. De fato, Balsanelli e colaboradores (2010) mostraram indução dos genes de biossíntese de dTDP-ramnose na presença de plântulas de milho e aumento do grau de polimerização do LPS. O gene *waal* e o operon de transportadores de LPS caracterizados anteriormente não foram analisados no transcriptoma pois sua expressão não apresentou valores de p confiáveis. Além da via de dTDP-ramnose, vários genes de biossíntese e modificação de monossacarídeos também mostraram expressão alterada nas análises transcriptômicas na rizosfera. Os genes *mur*, responsáveis pela biossíntese de peptídeoglicano, mostraram um decréscimo na expressão de 2 vezes nas células aderidas 1 d.a.i. comparados às células plantônicas. Além disso, os genes codificantes para mureína transglicosidase lítica *Hsero\_3419* e *3582* foram 6 vezes induzidos nesta condição, sugerindo uma camada de peptídeoglicano mais frouxa. Juntamente com este peptídeoglicano relaxado e LPS alterado, várias proteínas de membrana e secretadas foram superexpressas nas

células aderidas 1 d.a.i., incluindo as porinas de membrana externa Hsero\_0677 e 1043 (2 vezes); a proteína de membrana Hsero\_2393 (6 vezes) que apresenta três domínios BON, encontrados em secretinas e hemolisinas (YEATS e BATEMAN, 2003); e a lipoproteína exportada Hsero\_2697 (15 vezes). Tadra-Sfeir e colaboradores (2011) reportaram que a presença do flavonóide naringenina causa modificação da estrutura da cápsula em *H. seropedicae*, sugerindo que sinais derivados da planta como flavonoides modulam a expressão gênica bacteriana. Em 3 d.a.i., as células aderidas superexpressaram os genes *Hsero\_0588*, *1168* e *1219* (102, 11 e 5 vezes respectivamente) que codificam para sistemas de exportação de polissacarídeos tipo ExbD; e *Hsero\_2761* (7 vezes) que codifica para proteína de exportação de polissacarídeos Wza, sugerindo uma alta produção de polissacarídeos. Entretanto, não foi observada expressão significativa dos genes *eps* em nenhuma das condições, sugerindo uma repressão da biossíntese de EPS durante crescimento em meio mínimo e colonização da rizosfera. Outros genes de biossíntese de exopolissacarídeos ainda não identificados poderiam ser ativados, ou os transportadores são responsáveis pela exportação de LPS.

#### 6.18.4. Pili tipo IV pode ser requerido para adesão na superfície radicular

Pili Tipo IV é descrito como mediador de motilidade, conjugação, formação de biofilme e autoagregação. Ele pode promover a ligação a uma variedade de superfícies, inertes ou biológicas, mediando a colonização desta superfície. Na

montagem de um filamento de pili Tipo IV, sequências líder pré-pilina são clivadas por PilD, e as pilinas processadas (PilA, E, V, W, X ou FimU) são montadas pela ação de PilBC. O filamento é então exportado pela membrana externa por um poro multimérico formado por PilQ, estabilizado pela lipoproteína PilP. PilGOMRST também são requeridos para a montagem do componente de membrana interna (revisado por CRAIG e LI, 2008).

Com a exceção da ATPase de retração PilT, os genes que codificam para o pili Tipo IV são escassamente expressos nas bactérias crescidas em meio mínimo, mostrando leituras abaixo da cobertura mínima de corte. As células plantônicas em 1 d.a.i. expressam os genes *pilOPQRSM* cerca de 10 vezes mais em média do que em meio mínimo. Esta indução não foi observada nas duas populações aderidas ou na plantônica 3 d.a.i., sugerindo uma função inicial do pili Tipo IV na quimiotaxia e adesão à planta. Além destes genes *pil* envolvidos na montagem do aparato, nenhum gene codificador para pilina foi diferencialmente expresso na presença da planta, embora foi observada uma indução não-significativa de *pilV* (26 vezes,  $p=0,33$ ). O pili Tipo IV pode ser requerido para adesão bacteriana no primeiro contato com o hospedeiro, explicando a indução dos genes de montagem do aparato em 1 d.a.i, e mediado pela pilina alternativa PilV (principalmente expressa nas células aderidas 1 d.a.i.).

*H. seropedicae* também possui em seu genoma um agrupamento gênico que codifica para os sistemas de secreção de proteínas do Tipo III e VI, descritos em outras bactérias como envolvidos na secreção de proteínas efetoras que regulam a

resposta do hospedeiro para a colonização (CORNELIS, 2006; FILLOUX, HACHANI e BLEVES, 2008). Os genes do SST3 não foram expressos em nenhuma das condições testadas, com a maioria dos genes não apresentando leituras mapeadas. Os genes do SST6, que são expressos nas bactérias crescidas em meio mínimo, foram reprimidos na rizosfera (entre 5 a 20 vezes), sugerindo que este sistema não é necessário durante os primeiros estágios de colonização da planta.

#### 6.18.5. Sensoriamento ambiental na rizosfera

O sistema de quimiotaxia (genes *che*) opera via proteínas aceptoras de metil (MCPs), que podem induzir autofosforilação de uma histidina quinase central (CheA) que então fosforila o regulador de resposta (CheY). As outras proteínas envolvidas (CheW, R, B e Z) atuam como adaptadores entre as MCPs e CheA, ou modulam o estado de metilação das MCPs e na defosforilação de CheY (LI e HAZELBAUER, 2004). *H. seropedicae* possui 66 genes codificantes para MCPs e 32 genes *che* dispersos no genoma. Nenhuma clara regulação dos genes *che* foi observada nas condições testadas, mas a expressão de algumas MCPs foi dependente da condição bacteriana. *Hsero\_2723* é a única MCP induzida pela presença do hospedeiro em todas as populações. Por outro lado, *Hsero\_0976* e *Hsero\_3720* foram induzidas em ambas amostras plantônicas, mas não nas aderidas. *Hsero\_1141*, *Hsero\_2021* e *Hsero\_4315* parecem ser especificamente induzidas nas células aderidas em 1 d.a.i.,

*Hsero\_2299* e *Hsero\_4538* nas células plantônicas 1 d.a.i. e *Hsero\_2724* nas células plantônicas 3 d.a.i.

Sistemas de dois componentes também estão envolvidos com sensoramento ambiental, regulando a expressão gênica em resposta a sinais externos (STOCK, ROBINSON e GOUDREAU, 2000). As células plantônicas expressam um agrupamento de cinco genes sensores/reguladores (*Hsero\_3733-3737*) cerca de 10 vezes mais do que as células aderidas em 1 e 3 d.a.i. Além disso, as células plantônicas em 3 d.a.i. superexpressam os sistemas de dois componentes *Hsero\_2569*, *Hsero\_3507* e *Hsero\_3508* (8, 12 e 15 vezes), enquanto as células aderidas superexpressam *Hsero\_2200* (9 vezes). A expressão diferencial de diversas MCPs e sistemas de dois componentes durante a colonização da rizosfera sugere um sistema sensor bacteriano de amplo espectro para um ambiente variante. Alterações nestes sistemas podem ter consequências no comportamento de interação, como observado na diminuição da capacidade competitiva de um mutante de *Rhizobium leguminosarum* no sensor/regulador de dois componentes RL2946 (RAMACHANDRAN *et al.*, 2011).

#### 6.18.6. Defesa bacteriana contra compostos químicos vegetais

Através da exudação de uma ampla variedade de compostos, as raízes das plantas podem regular a comunidade microbiana do solo em sua vizinhança imediata (NARDI *et al.*, 2000; WALKER *et al.*, 2003). A sobrevivência das células radiculares

sob condições naturais depende de um controle químico contínuo mediado pela secreção de fitoalexinas, proteínas de defesa, e outros compostos ainda desconhecidos (FLORES *et al.*, 1999). Um mecanismo comum que bactérias utilizam para escapar dos efeitos tóxicos de compostos químicos é o efluxo ativo de drogas estruturalmente não-relacionadas do interior da célula. Durante a colonização da rizosfera de milho, as células aderidas de *H. seropedicae* 3 d.a.i. mostraram um aumento da expressão dos sistemas de transporte multidrogas. Estes sistemas incluem as proteínas de efluxo cátion/multidrogas *Hsero\_0315* (25 vezes), *Hsero\_0482* (2 vezes), *Hsero\_3957* (2 vezes); o transportador drogas/metabólitos permease *Hsero\_3835* (2 vezes); e os sistemas de transporte multidrogas tipo ABC *Hsero\_4072* (3 vezes), *Hsero\_4073* (4 vezes), e o transportador mais expresso *Hsero\_4782* (55 vezes) comparados com as células plantônicas. O aumento da expressão destes genes nas células aderidas 3 d.a.i. é coincidente com a estagnação da população epifítica de raiz (em questão de número de bactérias por grama de raiz), sugerindo um controle populacional químico de *H. seropedicae* pela planta. Além disso, alterações na disponibilidade de carbono e oxigênio ou no pH do sistema poderiam modificar a expressão de genes de resistência.

#### 6.18.7. Hidrolases e esterases induzidas em bactérias aderidas

A colonização interna de raízes provavelmente envolve a secreção bacteriana de enzimas para degradação de parede celular da planta, como celulasas, xilanasas,



poligalacturonases, pectato liases e esterases de pectina, clivando os principais constituintes sacarídicos e afrouxando as paredes celulares. Várias bactérias não patogênicas associadas a plantas usam essa rota de entrada durante a colonização de seus hospedeiros (REINHOLD-HUREK *et al.*, 1993; KOVTUNOVYCH *et al.*, 1999; ELBELTAGY *et al.*, 2001; MEHDIPOUR-MOGHADDAM *et al.*, 2010). Apesar da ausência de genes conservados codificantes para proteínas de degradação de parede celular no genoma de *H. seropedicae* SmR1 (PEDROSA *et al.*, 2011), James e colaboradores (2002) reportaram uma baixa expressão *in vitro* de celulase e pectinase por *H. seropedicae* Z67. Dentre as várias enzimas geralmente classificadas como líticas codificadas por *H. seropedicae*, seis foram superexpressas principalmente nas células aderidas 3 d.a.i. (Fig. 34). *Hsero\_0721* codifica para uma metalohidrolase e *Hsero\_1852* para uma lipase/peptidase. *Hsero\_0317* codifica para uma proteína com um domínio parcial de esterase e um domínio alfa/beta hidrolase, e esta localizada no genoma a montante de uma proteína secretora HlyD com níveis similares de expressão, sugerindo a presença de um sistema de transporte para esta enzima. Similarmente, *Hsero\_1375* (que codifica para uma esterase/alfa-beta hidrolase) e *Hsero\_1376* (que codifica para uma hidrolase associada com invasão de parede celular) estão localizadas a jusante de uma permease. A análise das enzimas com PSORTb (YU *et al.*, 2010) mostrou que *Hsero\_1375* foi predita como exportada ou localizada na membrana externa, *Hsero\_1376* e *Hsero\_1852* apresentaram um peptídeo sinal de proteínas não citoplasmáticas, sugerindo que estas proteínas podem

ser secretadas ou corretamente posicionadas para a degradação da parede celular vegetal.

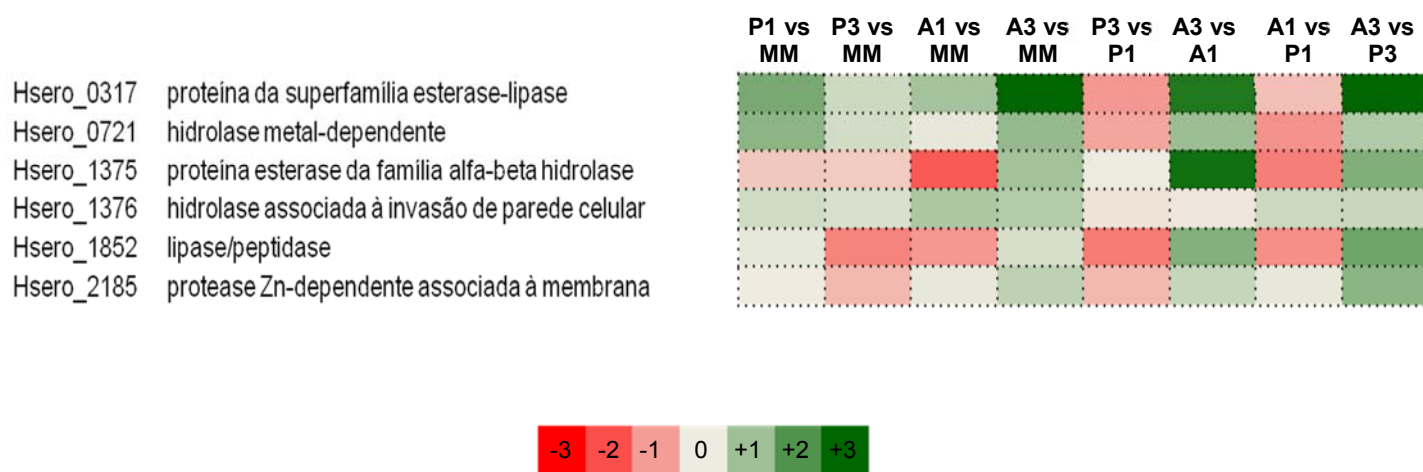


FIGURA 34 – EXPRESSÃO DE ENZIMAS LÍTICAS POR *H. seropedicae* NA RIZOSFERA. Mapa de calor representa o Log do módulo da diferença de expressão. P1: células plantônicas 1 d.a.i. P3: células plantônicas 3 d.a.i. A1: células aderidas 1 d.a.i. A3: células aderidas 3 d.a.i. MM: células crescidas em meio NFbHPN.

## 6.17. PERFIL TRANSCRIPTÔMICO DE *H. seropedicae* NA RIZOSFERA

Neste trabalho foram identificados alguns mecanismos moleculares de *H. seropedicae* para reconhecimento e colonização da planta, assim como troca de nutrientes durante a colonização da rizosfera de milho. Analisando os dados de transcriptoma das células plantônicas e aderidas foi possível prever os perfis de expressão bacteriana 1 e 3 dias após inoculação. Em 1 d.a.i., as bactérias estão mobilizando seus estoques de PHB, fixando e metabolizando nitrogênio, sensoriando

o ambiente e provavelmente usando o pili tipo IV e LPS para aderir na superfície radicular. Além disso, bactérias aderidas mostraram estrutura capsular rearranjada e sistemas de quimiotaxia específicos. Em 3 d.a.i., as bactérias continuam a fixar e metabolizar nitrogênio e sensoriar o ambiente por diferentes sistemas. Ademais, as células aderidas parecem exportar polissacarídeos e enzimas de degradação de parede celular vegetal. Em resumo, este trabalho revelou algumas adaptações moleculares de *H. seropedicae* para perceber o ambiente, aderir à superfície radicular e sobreviver nos primeiros estágios da colonização da rizosfera.

## 7. CONCLUSÕES

Neste estudo foi mostrado que a presença da porção de antígeno-O do LPS é essencial para uma colonização eficiente, função esta suportada pela indução da expressão dos genes de biossíntese de LPS durante colonização do rizoplane. Os resultados suportam a hipótese que *H. seropedicae* usa o LPS para aderir em receptores proteicos vegetais possivelmente pelo reconhecimento e ligação a lectinas radiculares. Assim, é sugerido um modelo em que os resíduos de N-acetil glucosamina do antígeno-O do LPS se ligam nas lectinas de raiz de milho (MRL1, 2 e 3). Além disso, a diminuição da colonização endofítica causada pela falta de antígeno-O sugere uma função importante do LPS contra as defesas basais da planta.

A mutação de genes envolvidos na biossíntese de EPS em *H. seropedicae* diminuiu a produção de EPS e consequentemente a formação de biofilme, mas surpreendentemente não alterou o perfil de colonização do hospedeiro vegetal. A função clássica descrita para o EPS como molécula de adesão de rizobactérias à planta parece ser preenchido em *H. seropedicae* pelo LPS. *H. seropedicae* parece parar o desenvolvimento do biofilme na raiz ao não produzir EPS, continuando assim disponível para buscar locais de penetração e fontes de nutrientes na rizosfera.

Foi identificada por PMF apenas a proteína FliC (flagelina) de membrana externa de *H. seropedicae* com potencial envolvimento na interação com a planta. Uma análise proteômica por LC-MS/MS de bactérias aderidas à superfície radicular

deve apontar com maior resolução se e quais proteínas estão envolvidas na associação com o hospedeiro vegetal.

À parte do LPS, neste trabalho foram identificados por análise transcriptômica alguns mecanismos moleculares de *H. seropedicae* para reconhecimento e colonização da planta, assim como troca de nutrientes durante a colonização da rizosfera de milho. Em 1 d.a.i., as bactérias estão mobilizando seus estoques de PHB, fixando e metabolizando nitrogênio, sensoriando o ambiente e provavelmente usando o pili tipo IV e LPS para aderir na superfície radicular. Além disso, bactérias aderidas mostraram estrutura capsular rearranjada e sistemas de quimiotaxia específicos. Em 3 d.a.i., as bactérias continuam a fixar e metabolizar nitrogênio e sensoriar o ambiente por diferentes sistemas. Ademais, as células aderidas parecem exportar polissacarídeos e enzimas de degradação de parede celular vegetal. Em resumo, este trabalho revelou algumas adaptações moleculares de *H. seropedicae* para colonizar a rizosfera.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASTUA-MONGE, G.; FREITAS-ASTUA, J.; BACOCINA, G.; RONCOLETTA, J.; CARVALHO, S.A.; MACHADO, M.A. Expression profiling of virulence and pathogenicity genes of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. **J. Bacteriol.** 187:1201-1205, 2005.
- BACHHAWAT, A.K.; GHOSH, S. Iron transport in *Azospirillum brasilense*: role of the siderophore spirilobactin. **J. Gen. Microbiol.** 133:1759-65, 1987.
- BALDANI, J. I.; CARUSO, L.; BALDANI, V. L. D; SELDIN, L. AND DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry.** 29: 91-92, 1997.
- BALDANI, J. I.; POT, B.; KIRCHHOF, G.; FALSEN, E.; BALDANI, V. L. D; OLIVARES, F. L. AND DÖBEREINER, J. Emended Description of *Herbaspirillum*; Inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a Mild Plant Pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov.; and Classification of a Group of Clinical Isolates (EF Group 1) as *Herbaspirillum* Species 3. **Int. Jornal of Systematic Bacteriology.** 46: 802–810, 1996.
- BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SELDIN, L.; DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, 36: 86-93, 1986.
- BALDANI, V. L. D.; OLIVARES, F. L. AND DÖBEREINER, J. Selection of *Herbaspirillum* spp. strains associated with rice seedlings amended with <sup>15</sup>N-labelled fertiliser. In: **International Symposium on Sustainable Agriculture for the Tropics – the role of biological nitrogen fixation. Resumos.** Angra dos Reis: EMBRAPA, p.202-203, 1995.
- BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.; OLIVARES, F. L. AND DÖBEREINER, J. Identification and ecology of *Herbaspirillum seropedicae* and closely related *Pseudomonas rubrisubalbicans*. **Symbiosis.** 13: 65-73, 1992.
- BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I.; DOBEREINER, J. Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp. **Biol. Fertil. Soils** 30:485-491, 2000.

- BALSANELLI, E.; SERRATO, R.V.; DE BAURA, V.A.; SASSAKI, G.; YATES, M.G.; RIGO, L.U.; PEDROSA, F.O.; DE SOUZA, E.M.; MONTEIRO, R.A. *Herbaspirillum seropedicae* *rfbB* and *rfbC* genes are required for maize colonization. **Environ. Microbiol.** 12:2233-2244, 2010
- BARNHART, M.M.; CHAPMAN, M.R. Curli biogenesis and function. **Annu. Rev. Microbiol.** 60:131-147, 2006.
- BARON, C.; ZAMBRYSKY, P. C. The plant response in pathogenesis, symbiosis and wounding: variations on a common theme? **Annual Review of Genetics.** 29: 107-129, 1995.
- BARRAQUIO, W.L., GUZMAN, M.R., BARRION, M., WATANABE, E.I. Population of aerobic heterotrophic nitrogen-fixing bacteria associated with wetland and dryland rice. **Appl. Environ. Microbiol.** 42: 124-128, 1982.
- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). **Canadian Journal of Microbiology.** 43: 103-121, 1997.
- BHATTACHARYYA, P.N.; JHA, D.K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. **World J Microbiol Biotechnol.** 28:1327-50, 2012.
- BERTALAN *et al.* Complete genome sequence of the sugarcane nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5. **BMC Genomics.** 10:450, 2009.
- BODDEY, R.M.; DE OLIVEIRA, O.C.; URQUIAGA, S.; REIS, V.M.; OLIVARES, F.L.; BALDANI, V.L.D.; DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: contributions and prospects for improvement. **Plant Soil.** 174: 195-209, 1995.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Anal. Biochem.** 72: 248-254, 1976.
- BRAUN, S.G., MEYER, A., HOLST, O., PÜHLER, A., NIEHAUS, K. Characterization of the *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* Lipopolysaccharide Substructures

- Essential for Elicitation of an Oxidative Burst in Tobacco Cells. **Mol. Plant-Microbe Interac.** 18: 674-681, 2005.
- BRENCIC, A; WINANS, S.C. Detection of and response to signals involved in host-microbe interactions by plant-associated bacteria. **Microbiol. Mol. Bio. Rev.** 69: 155-194, 2005.
- BROUGHTON, W.J. et al. Flavonoid-Inducible Modifications to Rhamnan O Antigens Are Necessary for *Rhizobium* sp Strain NGR234 – Legume Symbioses. **Journal of Bacteriology.** 188: 3654-3663, 2006.
- BURDMAN, S.; JURKEVITCH, E.; SCHWARTSBURD, B.; OKON, Y. Involvement of outer-membrane proteins in the aggregation of *Azospirillum brasilense*. **Microbiol.** 145: 1145–52, 1999.
- BURDMAN, S.; OKON, Y. e JURKEVITCH, E. Surface characteristics of *Azospirillum brasilense* in relation to cell aggregation and attachment to plant roots. **Crit. Rev. Microbiol.** 26: 91–110, 2000.
- BURRIS, R.H. Nitrogenases. **J. Biol. Chem.** 266: 9339-9342, 1991.
- BUSH, D.S. Calcium regulation in plant cells and its role in signalling. **Ann. Rev. of Plant Physiol. and Plant Mol. Biol.** 27: 953-967, 1995.
- CAMPBELL, G.R.O.; REUHS, B.L.; WALKER, G.C. Chronic intracellular infection of alfalfa nodules by *Sinorhizobium meliloti* requires correct lipopolysaccharide core. **PNAS.** 99: 3938-3943, 2002.
- CAO, H.; BALDINI, R.L.; RAHME, L.G. Common mechanisms for pathogens of plants and animals. **Annu. Rev. Phytopathol.** 39:259-284, 2001.
- CARLSON, R.W. Heterogeneity of *Rhizobium* lipopolysaccharides. **J Bacteriol.** 158: 1012-17, 1984.
- CASTELLANOS, T.; ASCENCIO, F.; BASHAN, Y. Cell-surface lectins of *Azospirillum* spp. **Curr. Microbiol.** 36:241–44, 1998.
- CHAPMAN, M.R.; KAO, C.C. EpsR modulates production of extracellular polysaccharides in the bacterial wilt pathogen *Ralstonia* (*Pseudomonas*) *solanacearum*. **J. Bacteriol.** 180: 27–34, 1998.



- CHENG, H.P.; WALKER G.C. Succinoglycan is required for initiation and elongation of infection threads during nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. **J. Bacteriol.** 180: 5183–5191, 1998.
- CHOU, F.L.; CHOU, H.C.; LIN, Y.S.; YANG, B.Y.; LIN, N.T.; WENG, S.F.; TENG, Y.H. The *Xanthomonas campestris gumD* gene required for synthesis of xanthan gum is involved in normal pigmentation and virulence in causing black rot. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 233:265-269, 1997.
- CHRISTOPHER, W.N.; EDGERTON, C.W. Bacterial stripe diseases of sugarcane in Louisiana. **J. Agricult. Research.** Queensland, 41: 259, 1932.
- COLLINS, P.M.; FERRIER, R.J. **Monosaccharides: their chemistry and their roles in natural products**. Ed. John Wiley & Sons, p. 463-524, 1995.
- COSTERTON, J.W.; LAWANDOWSKI, Z.; CALDWELL, D.E.; KORBER, D.R.; LAPPIN-SCOTT, H.M. Microbial biofilms. **Ann. Rev. Microbiol.** 49: 711-745, 1995.
- CRAIG, L.; PIQUE, M.E.; TAINER, J.A. Type IV pilus structure and bacterial pathogenicity. **Nat. Rev. Microbiol.** 2:363-378, 2004.
- CROES, C.L.; MOENS, S.; VAN BASTELAERE, E.; VANDERLEYDEN, J.; MICHIELS, K.W. The polar flagellum mediates *Azospirillum brasilense* adsorption to wheat roots. **J. Gen. Microbiol.** 139:2261-2269, 1993.
- CRUZ, L.M.; SOUZA, E.M.; WEBER, O.B.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J.; PEDROSA, F.O. 16S ribosomal DNA characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from banana (*Musa* spp.) and pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merrill). **Applied and Environmental Microbiology**, 67: 2375-2379, 2001.
- DALTON, H.M.; GOODMAN, A.E.; MARSHALL, K.C. Diversity in surface colonization behavior in marine bacteria. **J. Ind. Microbiol.** 17:228–34, 1996.
- DANHORN, T.; FUQUA, C. Biofilm formation by plant-associated bacteria. **Annu. Rev. Microbiol.** 61: 401-422, 2007.
- DAVIES, D.G.; PARSEK, M.R.; PEARSON, J.P.; IGLEWSKI, B.H.; COSTERTON, J.W.; GREENBERG, E.P. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. **Science** 280:295–98, 1998.

- DE WEERT, S.; VERMEIREN, H.; MULDER, I. H. M.; KUIPER, I.; HENDRICKX, N.; BLOEMBERG, G. V.; VANDERLEYDEN, J.; DE MOT, R.; LUGTENBERG, B. J. J. Flagella-driven chemotaxis towards exudate components is an important trait for tomato root colonization by *Pseudomonas fluorescens*. **Mol. Plant-Microbe Interact.** 15:1173-1180, 2002.
- DE WEGER, L.A.; BAKKERS, A.H.M.; SCHIPPERS, B.; VAN LOOSDRECHT, M.C.M.; LUGTENBERG, B.J.J. *Pseudomonas* spp. with mutational changes in the O-antigenic side chain of their lipopolysaccharide are affected in their ability to colonize potato roots. **Signal Molecules in Plants and Plant-Microbe Interactions.** 36: 197- 202, 1989.
- DENNY, T. Involvement of bacterial exopolysaccharides in plant pathogenesis. **Ann. Rev. Phytopathol.** 33: 173-197, 1995.
- DIXON, R. A.; LAMB, C. J. Molecular communication in interactions between plants and microbial pathogens. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology.** 41: 339-367, 1990.
- DJORDJEVIC, M. A.; GABRIEL, D. W.; ROLFE, B. G. *Rhizobium* – the refined parasite of legumes. **Annual Review of Phytopathology.** 25: 145-168, 1987.
- DÖBEREINER, J. History and new perspectives of diazotrophs in association with non-leguminous plants. **Symbiosis.** 1: 1-13, 1992.
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; OLIVARES, F.L.; REIS, V.M. (1994) Endophytic diazotrophs: the key to BNF in gramineous plants. In: Hegazani NA, Fayez M, Monib M, eds. Nitrogen fixation with non-legumes. Cairo: American University in Cairo Press.
- DOMINGUEZ, D.C. Calcium signaling in bacteria. **Mol Microbiol.** 54: 291–297, 2004.
- DONG, Z.; CANNY, M.J.; MCCULLY, M.E.; ROBOREDO, M.R.; CABADILLA, C.F.; ORTEGA, E.; RODES R. A Nitrogen-Fixing Endophyte of Sugarcane Stems (A New Role for the Apoplast). **Plant Physiol.** 105: 1139-47, 1994.

- DUARTE-ALMEIDA, M., NOVOA, A.V., LINARES, A.F., LAJOLO, F.M., GENOVESE, I.M. Antioxidant activity of phenolics compounds from sugar cane (*Saccharum officinarum* L.) juice. **Plant Foods Hum. Nutr.** 61(4):187-92, 2006.
- DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.**, 28: 350-356, 1956.
- DUELLI, D.M.; NOEL, K.D. Compounds exuded by *Phaseolus vulgaris* that induce a modification of *Rhizobium etli* lipopolysaccharide. **Mol. Plant-Microbe Interact.** 10: 903-910, 1997.
- DURRANT, W.E. ; DONG, X. Systemic acquired resistance. **Annu. Rev. Phytopathol.** 42:185–209, 2004.
- ECONOMOU, A.; HAMILTON, W.D.O.; JOHNSTON, A.W.B.; DOWNIE, J.A. The *Rhizobium* nodulation gene *nodO* encodes a Ca<sup>2+</sup>-binding protein that is exported without N-terminal cleavage and is homologous to haemolysin and related proteins. **EMBO J.** 9: 349-357, 1990.
- EGENER, T., HUREK, T.; REINHOLD-HUREK, B. Endophytic expression of *nif* genes of *Azoarcus* sp. strain BH72 in rice roots. **Mol. Plant-Microbe Interact.** 12:813-819, 1999.
- EHRHARDT, D.W.; WAIS, R.; LONG, S.R. Calcium spiking in plant root hairs responding to *Rhizobium* nodulation signals. **Cell.** 85: 673-681, 1996.
- EIDELS, L.; OSBORN, M.J. Lipopolysaccharide and Aldoheptose Biosynthesis in Transketolase Mutants of *Salmonella typhimurium*. **PNAS** 68: 1673-77, 1971.
- ELBELTAGY, A.; NISHIOKA, K.; SATO, T., SUZUKI, H., YE, B., HAMADA, T., ISAWA, T.; MITSUI, H., MINAMISAWA, K. Endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. isolated from wild rice species. **Appl Environ Microbiol.** 67: 5285-93, 2001.
- ERRIDGE, C.; BENNET-GUERRERO, E.; POXTON, I.R. Structure and function of lipopolisaccharides. **Microb. Infect.** 4: 837-851, 2002.

- FEIL, H.; FEIL, W.S.; LINDOW, S.E. Contribution of fimbrial and afimbrial adhesins of *Xylella fastidiosa* to attachment to surfaces and virulence to grape. **Phytopathol.** 97:318-324, 2007.
- FELIX, G.; DURAN, J.D.; VOLKO, S.; BOLLER, T. Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. **Plant J.** 18:265–276, 1999.
- FELLE, H.H., KONDOROSI, E., KONDOROSI, A., and SCHULTZE, M. The role of ion fluxes in Nod-factor signaling in *Medicago sativa*. **Plant J.** 13: 455-463, 1998.
- FINN, R.D; MISTRY J, TATE J, COGGILL P, HEGER A, POLLINGTON JE, GAVIN OL, GUNESSEKARAN P, CERIC G, FORSLUND K, HOLM L, SONNHAMMER EL, EDDY SR, BATEMAN A. The Pfam protein families database. **Nucleic Acids Res** 38: D211-222, 2010.
- FREER, E., MORENO, E., MORIYÓN, I., PIZARRO-CERDÁ, J., WEINTRAUB, A., e GORVEL, J. P. *Brucella-Salmonella* lipopolysaccharide chimeras are less permeable to hydrophobic probes and more sensitive to cationic peptides and EDTA than are their native *Brucella* sp. counterparts. **J. Bacteriol.** 178:5867-5876, 1996.
- FREIBERG, C. Molecular basis of the symbiosis between *Rhizobium* and legumes. **Nature.** 387: 394-401, 1997.
- FU, H., BURRIS, R.H. Ammonium inhibition of nitrogenase activity in *Herbaspirillum seropedicae*. **Journal of Bacteriology.** 171: 3168-3175, 1989.
- FUENTES-RAMIREZ, L.E.; JIMENEZ-SALGADO, T.; ABARCA-OCAMPO, I.R. *Acetobacter diazotrophicus*, an indolacetic acid producing bacterium from sugar cane cultivars of Mexico. **Plant and Soil.** 154: 117-128, 1993.
- FUJISHIGE, N.A.; KAPADIA, N.N.; DE HOFF, P.L.; HIRSCH, A.M. Investigations of *Rhizobium* biofilm formation. **FEMS Microbiol. Ecol.** 56: 195–206, 2006.
- FUJISHIGE, N.A.; KAPADIA, N.N.; DE HOFF, P.L.; HIRSCH, A.M. Investigations of *Rhizobium* biofilm formation. **FEMS Microbiol. Ecol.** 56:195–206, 2006.
- GAO, M., D'HAENZE, W., RYCHE, R., WOLUCKA, B., and HOLSTERS, M. Knockout of an Azorhizobial dTDP-L-Rhamnose Synthase Affects Lipopolysaccharide and

- Extracellular Polysaccharide Production and Disables Symbiosis with *Sesbania rostrata*. **Mol. Plant-Microbe Interact.** 14: 857-866, 2001.
- GEHRING, C.A., IRVING, H.R., KABBARA, A.A., PARISH, R.W., BOUKLI, N.M., and BROUGHTON, W.J. Rapid, plateau-like increases in intracellular free calcium are associated with Nod-factor-induced root hair deformation. **Mol. Plant-Microbe Interact.** 10: 791-802, 1997.
- GERLACH, R.G.; HENSEL, M. Protein secretion systems and adhesins: The molecular armory of gram-negative pathogens. **Int. J. Med. Microbiol.** 297:401-415, 2007.
- GILLIS, M.; TRAN VAN, V.; BARDIN, R.; GOOR, M.; HEBBAR, P.; WILLEMS, A.; SEGERS, P.; KERTERS, K.; KEULIN, T.; FERNANDEZ, M.P. Polyfasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and the proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. for N<sub>2</sub> fixing isolates from rice in Vietnam. **Int. Syst. Bacteriol.** 45: 274-289, 1995.
- GLASER, L. Bacterial cell surface polysaccharides. **Ann. Rev. Biochem.** 42: 91-112, 1973.
- GOMEZ-GOMEZ, L. & BOLLER, T. Flagellin perception: a paradigm for innate immunity. **Trends Plant Sci.** 7:251–256, 2002.
- GONZÁLEZ, J.E.; REUHS, B.L.; WALKER, G.C. Low molecular weight EPS II of *Rhizobium meliloti* allows nodule invasion in *Medicago sativa*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 93: 8636–8641, 1996.
- GOOSEN-DEROO, L.; DE MAAGD, R.A.; LUGTENBERG, B.J. Antigenic changes in lipopolysaccharide I of *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae* in root nodules of *Vicia sativa* subsp. *Nigra* occur during release from infection threads. **J. Bacteriol.** 173: 3177-183, 1991.
- GOTTIG, N.; GARAVAGLIA, B.S.; GAROFALO, C.G.; ORELLANO, E.G.; OTTADO, J. A filamentous hemagglutinin-like protein of *Xanthomonas axonopodis* pv *citri*, the phytopathogen responsible for citrus canker, is involved in bacterial virulence. **Plos One** 4(2): e4358, 2009.

- GUILHABERT, M.R.; KIRKPATRICK, B.C. Identification of *Xylella fastidiosa* antivirulence genes: Hemagglutinin adhesins contribute to *X. fastidiosa* biofilm maturation and colonization and attenuate virulence. **Mol. Plant-Microbe Interact.** 18:856-868, 2005.
- GYANESHWAR, P., JAMES, E. K., REDDY P. M., LADHA, J. K. *Herbaspirillum* colonization increases growth and nitrogen accumulation in aluminium-tolerant rice varieties. **New Phytologist.** 154: 131-145, 2002.
- HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J.W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the environment to infectious disease. **Nat Rev Microbiol** 2: 95–108, 2004.
- HALVERSON, L.J., STACEY, G. Signal exchange in plant-microbe interactions. **Microbiol Rev.** 50(2):193-225, 1986.
- HAYWARD, A.C. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. **Annu. Rev. Phytopathol.** 29:65–108, 1991.
- HEYDORN, A.; NIELSEN, A.T.; HENTZER, M., STERNBERG, C.; GIVSKOV, M.; *et al.* Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. **Microbiol.** 146:2395–407, 2000.
- HOLLAND, B., JONES, H.E., CAMPBELL, A.K., JACQ, A. An assessment of the role of intracellular free Ca<sup>2+</sup> in *E. coli*. **Biochimie.** 81: 901–907, 1999.
- HUANG, W.E, HUANG, L., PRESTON, G.M., NAYLOR, M., CARR, J.P., LI, Y., SINGER, A.C., WHITELEY, A.S., WANG, H. Quantitative in situ assay of salicylic acid in tobacco leaves using a genetically modified biosensor strain of *Acinetobacter* sp. ADP1. **Plant J.** 46:1073–1083, 2006.
- HUREK, T.; HANDLEY, L.L.; REINHOLD-HUREK, B.; PICHÉ, Y. *Azoarcus* grass endophyte contribute fixed nitrogen to the plant in an unculturable state. **Mol. Plant Microbe Interac.** 15:233-244, 2002.
- HUSSAIN, A.; KELMAN, A. Relation of slime production to mechanism of wilting and pathogenicity of *Pseudomonas solanacearum*. **Phytopathology.** 48:155–165, 1958.
- ICHINOSE, Y.; SHIMIZU, R.; IKEDA, Y.; *et al.* Need for flagella for complete virulence of *Pseudomonas syringae* pv *tabaci*. genetic analysis with flagella-defective

- mutants  $\Delta fliC$  and  $\Delta fliD$  in host tobacco plants. **J. Gen. Plant Pathol.** 69: 244-249, 2003.
- INIGUEZ, A.L.; DONG, Y.; TRIPLETT, E.W. Nitrogen fixation in wheat provided by *Klebsiella pneumoniae* 342. **Mol. Plant Microbe Interac.** 17:1078-1085, 2004.
- JAMES, E. K.; OLIVARES, F. L. Infection and colonization of sugarcane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. **Crit. Rev. Plant Sci.** 17: 77-119, 1998.
- JAMES, E. K.; OLIVARES, F. L.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. *Herbaspirillum*, an endophytic diazotroph colonizing vascular tissue in leaves of *Sorghum bicolor* L. Moench. **Journal of Experimental Botany.** 48: 785-797, 1997.
- JAMES, E.K; GYANESHWAR, P.; MATHAN, N. Infection and Colonization of Rice Seedlings by the Plant Growth-Promotion Bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. **Mol. Plant Microbe Interac.** 15:894-906, 2002.
- JANCZAREK, M.; KUTKOWSKA, J.; PIERSIAK, T.; SKORUPSKA, A. *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* *rosR* is required for interaction with clover, biofilm formation and adaptation to the environment. **BMC Microbiol.** doi:10.1186/1471-2180-10-284, 2010.
- JANNSON, P.E.; LINDBERG, A.A.; LINDBERG, B.; WOLLIN, R. Structural studies on the hexose region of the core, exopolysaccharide production, and root colonization in *Azospirillum brasilense*. **FEMS Microbiol. Lett.** 231: 267-275, 1981.
- JOFRÉ, E.; LAGARES, A.; MORI, G. Disruption of dTDP-rhamnose biosynthesis modifies lipopolysaccharide core, exopolysaccharide production and root colonization in *Azospirillum brasilense*. **FEMS Microbiol.** 231: 267-275, 2004.
- JONES, D.A.; TAKEMOTO, D. Plant innate immunity – direct and indirect recognition of general and specific pathogen-associated molecules. **Curr. Opin. Immunol.** 16: 48-62, 2204.
- KANEKO, T.; NAKAMURA, Y.; SATO, S.; MINAMISAWA, K., *et al.* Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. **DNA Res.** 9:189-97, 2002.

- KANNENBERG, E.L.; BREWIN, N.J. Host-plant invasion by *Rhizobium*: the role of cell-surface components. **Trends Microbiol.** 8:277–283, 1994.
- KANNENBERG, E.L.; REUHS, B.L.; FORSBERG, L.S.; CARLSON, R.W. Lipopolysaccharides and K-antigens: their structure, biosynthesis and functions. In: **The Rhizobiaceae**. Ed. H.P. SPAINK; A. KONDOROSI; P.J.J. HOOYKAAS. Dordrecht:Kluwer Academic Publisher, pp. 154, 1998.
- KEYSER, H.H.; LI, F. Potential for increasing biological nitrogen fixation in soybean. **Plant and Soil** 141: 119-135, 1992.
- KLASSEN, G.; PEDROSA, F.O.; SOUZA, E.M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L.U. Effect of nitrogen compounds on nitrogenase activity in *Herbaspirillum seropedicae* SmR1. **Can. J. Microbiol.** Ottawa, 43: 887-891, 1997.
- KLEMM, P.; SCHEMBRI, M.A. Bacterial adhesins: Function and structure. **Int. J. Med. Microbiol.** 290:27-35, 2000.
- KLOEPPER, J. W.; BEAUCHAMP, C. J. A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria. **Canadian Journal of Microbiology.** 38: 1219-1232, 1992.
- KOBAYASHI, H. *et al.* Flavonoids induce temporal shifts in gene expression of nod-box controlled loci in *Rhizobium* sp. NGR234. **Mol. Microbiol.** 51: 335-347, 2004.
- KOCZAN, J.M.; MCGRATH, M.J.; ZHAO, Y.; SUNDIN, G.W. Contribution of *Erwinia amylovora* exopolysaccharides amylovoran and levan to biofilm formation: Implications in pathogenicity. **Phytopathol.** 99: 1237–1244, 2009.
- KOKOTEK, W.; LOTZ W. Construction of a lacZ-kanamycin-resistance cassette, useful for site-directed mutagenesis and as a promoter probe. **Gene.** 84(2):467-71, 1989.
- KORBER, D.R.; LAWRENCE, J.R.; LAPPIN-SCOTT, H.M.; COSTERTON, J.W. Growth of microorganisms on surfaces. In **Microbial Biofilms**, ed. HM Lappin-Scott, JW Costerton. Cambridge, UK: Cambridge Univ. Press, p. 15–45, 1995.
- KOUTSOUDIS, M.D.; TSALTAS, D.; MINOGUE, T.D.; VON BODMAN, S.B. Quorum-sensing regulation governs bacterial adhesion, biofilm development, and host



- colonization in *Pantoea stewartii* subspecies *stewartii*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 103: 5983–5988, 2006.
- KRIEG, N. R., e HOLT, J. G., eds. *Bergey's Manual of Systemic Bacteriology*. Vol. 1. **Williams and Wilkins**, Baltimore, MD, U.S.A, 1984.
- LADHA, J. K.; KIRK, G. J. D.; BENNETT J.; *et al.* Opportunities for increased nitrogen use efficiency from improved lowland rice germplasm. **Field Crops Research**, v. 56, p. 41–71, 1998.
- LADHA, J.K. & REDDY, P.M. Extension of nitrogen fixation to rice necessity and possibilities. **GeoJournal**. 35: 363-372, 1995.
- LADHA, J.K. & REDDY, P.M. Nitrogen fixation in rice systems: state of knowledge and future prospects. **Plant and Soil**. 38: 1219-1232, 2003.
- LADHA, J.K.; BRUIJN, F.J.; MALIK, K.A. Assessing opportunities for nitrogen fixation in rice: a frontier project. **Plant and Soil**. 194: 1-10, 1997.
- LATASA, C.; SOLANO, C.; PENADES, J.R.; LASA, I. Biofilm-associated proteins. **C. R. Biol.** 329:849-857, 2006.
- LAUS, M.C.; VAN BRUSSEL, A.A.N.; KIJNE, J.W. Exopolysaccharide structure is not a determinant of host-plant specificity in nodulation of *Vicia sativa* roots. **MPMI**. 18: 1123-1129, 2005.
- LE QUÉRE, A., DEAKIN, W.J., SCHMEISSER, C., CARLSON, R.W., STREIT, W.R., BROUGHTON, W.J., FORSBERG, L.S. Structural characterization of a K-antigen capsular polysaccharide essential for normal symbiotic infection in *Rhizobium* sp. NGR234. **J. Biolol. Chem.** 281(39): 28981-992, 2006.
- LECOURIEUX, D., RANEVA, R., PUGIN, A. Calcium in plant defense signalling pathways. **New Phytol.** 171: 249-269, 2006.
- LEIGH, J.A.; COPLIN, D.L. Exopolysaccharides in plant-bacteria interaction. **Annu. Rev. Microbiol.** 46:307-346, 1992.
- LEIGH, J.A.; REED, J.W.; HANKS, J.F.; HIRSCH, A.M.; WALKER, G.C. *Rhizobium meliloti* mutants that fail to succinilate their calcofluor-binding exopolysaccharide are defective in nodule invasion. **Cell**. 51:579-587, 1987.

- LEIGH, J.A.; WALKER, G.C. Exopolysaccharides of *Rhizobium*: synthesis, regulation and symbiotic function. **Trends in Genet.** 10: 63-67, 1994.
- LEROUGE, I.; VANDERLEYDEN, J. O-antigen structural variation: mechanisms and possible roles in animal/plant-microbe interactions. **FEMS Microbiol. Rev.** 26:17-47, 2001.
- LIMPENS, E.; FRANKEN, C.; SMIT, P.; WILLEMSE, J.; GEURTS, R. LysM Domain Receptor Kinases Regulating Rhizobial Nod Factor-Induced Infection. **Science.** 302: 630-633, 2003.
- LONG, S.R.; STAKAWICZ, B.J. Prokaryotic plant parasites. **Cell.** 73(5):921-35, 1993.
- LÜDERRITZ, O., WESTPHAL, O. STAUBE, A.M., NIKAIDO, H. Isolation and chemical and immunological characterization of bacterial lipopolysaccharides. In: Microbial Toxins. Eds. Weinbaum, G., Kadis, S. and Ali, S.J. **Academic Press**, New York, 4(4): 145-233, 1971.
- MAAGD, R.A.; WIJFFELMAN, C.A.; PEES, E. LUGTENBERG, B.J.J. Isolation and characterization of three classes of mutants of *Rhizobium leguminosarum* with altered lipopolysaccharides. In: Nitrogen Fixation: hundred years after. Ed. H. BOTHE, F.J. DE BRUIJN, W.E. NEWTON. Stuttgart, Fisher, p. 473-492, 1988.
- MACHADO, I. M. P.; YATES, M.G.; MACHADO, H. B.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Cloning and sequence of the nitrogenase structural genes *nifHDK* of *Herbaspirillum seropedicae*. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 29: 1599-1602, 1996.
- MACNAB, R.M. How bacteria assemble flagella. **Annu. Rev. Microbiol.** 57: 77-100, 2003.
- MALIK, K.A.; RAKHSHANDA, B.; MEHNAZ, S.; RASUL, G.; MIRZA, M.S.; ALI, S. Association of nitrogen-fixing plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) with kallar grass and rice. **Plant Soil.** 194: 37-44, 1997.
- MARIE, C., DEAKIN, W.J., OJANEN-REUHS, T., DIALLO, E., REUHS, B., BROUGHTON, W.J., PERRET, X. TtsI, a key regulator of *Rhizobium* species NGR234 is required for type III-dependent protein secretion and synthesis of rhamnose-rich polysaccharides. **Mol. Plant-Microbe Interac.** 17(9): 958-966, 2004.

- MARTINEZ-ABARCA, F., HERRERA-CERVERA, J. A., BUENO, P., SANJUAN, J., BISSELING, T., OLIVARES, J. Involvement of Salicylic Acid in the Establishment of the *Rhizobium meliloti*-Alfalfa Symbiosis. **Mol. Plant-Microbe Interact.** 11:153–155, 1998.
- MATHYSSE, A.G. Initial interactions of *Agrobacterium tumefaciens* with plant host cells. **Appl. Environ. Microbiol.** 13: 281-307, 1986.
- MATTHYSSE, A. G.; MCMAHAN, S. Root colonization by *Agrobacterium tumefaciens* is reduced in *cel*, *attB*, *attD* and *attR* mutants. **Appl. Environ. Microbiol.** 64:2341-2345, 1998.
- MAZAR, J.; COTTER, P.A. Topology and maturation of filamentous haemagglutinin suggest a new model for two-partner secretion. **Mol. Microbiol.** 62:641-654, 2006.
- MENESES, C.H.S.G.; ROUWS, L.F.M.; SIMÕES-ARAÚJO, J.L.; VIDAL, M.S.; BALDANI, J.I. Exopolysaccharide production is required for biofilm formation and plant colonization by the nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Mol Plant-Microbe Interac**, 24: 1448–1458, 2011.
- METTS, J.; WEST, J.; DOARES, S.; MATTHYSE, A.G. Characterization of three *Agrobacterium tumefaciens* mutants with chromosomal mutations that affect induction of *vir* genes. **J. Bacteriol.** 173: 1080-87, 1991.
- MICHIELIS, K.W.; CROES, C.L.; VANDERLEYDEN, J. Two different modes of attachment of *Azospirillum brasilense* Sp7 to wheat roots. **J. Gen. Microbiol.** 137:2241-2246, 1991.
- MICHIELS, J., XI, C., VERHAERT, J., VANDERLEYDEN, J. The functions of Ca<sup>2+</sup> in bacteria: a role for EF-hand proteins? **Trends Microbiol** 10: 87–93, 2002.
- MILLER, J.F.; MEKALANOS, J.J.; FALKOW, S. Coordinate regulation and sensory transduction in the control of bacterial virulence. **Science.** 243: 916-922, 1989.
- MILLER, J.H. (1972) Experiments in molecular genetics. **Cold Spring Harbor, NY.**
- MONTEIRO, R.A., SCHMIDT, M.A., BAURA, V.A., BALSANELLI, E., WASSEM, R., YATES, M.G., RANDI, M.A.F., PEDROSA, F.O., SOUZA, E.M. Early colonization pattern of maize (*Zea mays* L. Poales, Poaceae) roots by *Herbaspirillum*

- seropedicae* (Burkholderiales, Oxalobacteraceae). **Genet. Mol. Biol.** 31(4): 932-937, 2008.
- MYLONA, P.; PAWLOWSKI, K.; BISSELING, T. Symbiotic Nitrogen Fixation. **The Plant Cell**. 7: 869-885, 1995.
- NAVARRO, L. *et al.* The transcriptional innate immune response to flg22. Interplay and overlap with Avr gene-dependent defense responses and bacterial pathogenesis. **Plant Physiol.** 135, 1113–1128, 2004.
- NOEL, K.D., VANDENBOSCH, K.A., e KULPAKA, B. Mutations in *Rhizobium phaseoli* that lead to arrested development of infection threads. **J. Bacteriol.** 168: 1392-1401, 1986.
- NOEL, K.D; DUELLI, D.M. *Rhizobium* lipopolysaccharide and its role in symbiosis. In: **Prokaryotic Nitrogen Fixation: A Model System for Analysis of a Biological Process**. Ed. E.W. TRIPLETT. Horizon Scientific Press, UK, p. 415-431, 2000.
- O'TOOLE, G.A.; KOLTER, R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. **Mol. Microbiol.** 30:295–304, 1998.
- OJANEN-REUHS, T.; KALKKINEN, N.; WESTERLUND-WIKSTROM, B.; VAN DOORN, J.; HAAHTELA, K.; NURMIAHO-LASSILA, E. L.; WENGELNIK, K.; BONAS, U.; KORHONEN, T. K. Characterization of the *fimA* gene encoding bundle- forming fimbriae of the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **J. Bacteriol.** 179:1280-1290, 1997.
- OLIVARES, F. L.; BALDANI, J. I.; JAMES, E. K.; DÖBEREINER, J. Infection of mottled stripe disease – susceptible and resistant sugar cane varieties by endophytic diazotroph *Hesbaspirillum*. **New Phytol.** 135: 723-737, 1997.
- OLIVARES, F. L.; BALDANI, V. L. D.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems and leaves predominantly of Gramineae. **Biol. Fertil. Soils.** 21: 197-200, 1996.
- OLIVARES, F. L.; DOS REIS, F. B.; REIS, V. M.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Infection of sugarcane roots by the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *H. rubrisubalbicans*. In: **International Symposium**

- and Sustainable Agriculture for the Tropics – The Role of Biological Nitrogen Fixation. BODDEY, R. M.; DE RESENDE, A. S. (eds.) EMBRAPA. 65 – 66, 1995.
- ORMEÑO-ORRILLO, E., ROSENBLUETH, M., LUYTEN, E., VANDERLEYDEN, J., MARTINEZ-ROMERO, E. Mutations in lipopolysaccharides biosynthetic genes impair maize rhizosphere and root colonization of *Rhizobium tropici* CIAT899. **Environ Microbiol** 10: 1271-84, 2008.
- PACE, G.W.; RHIGELATO, R.C. Production of extracellular microbial polysaccharides. **Adv. Biochem. Eng.** 15:41-70, 1980.
- PEDROSA, F.O., TEIXEIRA, K.R.S., MACHADO, I.M.P., STEFFENS, M.B.R., KLASSEN, G., BENELLI, E.M., MACHADO, H.B., FUNAYAMA, S., RIGO, L.U., ISHIDA, M.L., YATES, M.G., SOUZA, E.M. Structural organization and regulation of the *nif* genes of *Herbaspirillum seropedicae*. **Soil. Biol. Biochem.** 29:843-846, 1997.
- PEDROSA, F.O.; MONTEIRO, R.A.; WASSEM, R.; CRUZ, L.M. *et al.* Genome of *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1, a specialized diazotrophic endophyte of tropical grasses. **PLoS Genetics**. 7: e1002064, 2011.
- PEOPLES, M.B.; CRASWELL, E.T. Biological nitrogen fixation: investments, expectations and actual contributions to agriculture. **Plant and Soil**. 141(1): 13-39, 1992.
- PÉREZ-GIMÉNEZ, J.; MONGIARDINI, E.J.; ALTHABEGOITI, M.J.; COVELLI, J.; QUELAS, J.I.; LÓPEZ-GARCÍA, S.L.; LODEIRO, A.R. Soybean lectin enhances biofilm formation by *Bradyrhizobium japonicum* in the absence of plants. **Int. J. Microbiol.** doi:10.1155/2009/719367. 2009.
- POSTGATE, J. Biological nitrogen fixation: Fundamentals. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**. 296: 375-385, 1982.
- PRITHIVIRAJ, B., BAIS, H.P., WEIR, T., SURESH, B., NAJARRO, E.H., DAYAKAR, B.V., SCHWEIZER, H.P., VIVANCO, J.M. Down regulation of virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* by salicylic acid attenuates its virulence on *Arabidopsis thaliana* and *Caenorhabditis elegans*. **Infect. Immun.** 73:5319–5328, 2005.

- PUEPPKE, S.G. Adsorption of bacteria to plant surfaces. In: **Plant-Microbe Interactions**. Ed. T. KOSUGE, E.W NESTER. New York, p. 215-261, 1984.
- PÜHLER, A.; ARLAT, M.; BECKER, A.; GOTTFERT, M.; MORRISSEY, J.P.; O'GARA, F. What can bacterial genome research teach us about plant-bacteria interactions? **Curr. Opin. Plant Biol.** 7: 137-147, 2004.
- QUISPEL, A. A search for signals in endophytic microorganisms. **Molecular Signals in Plant-Microbe Communications**. p. 471-490, 1992.
- RAETZ, C.R.H. Biochemistry of endotoxins. **Annu. Rev. Biochem.** 59: 129-70, 1990.
- RAETZ, C.R.H.; WHITFIELD, C. Lipopolysaccharides endotoxins. **Annu. Rev. Biochem.** 71: 635-700, 1992.
- RAETZ, C.R.H.; REYNOLDS, C.M.; TRENT, M.S.; BISHOP, R.E. Lipid A modification systems in gram-negative bacteria. **Annu. Rev. Biochem.** 54: 412-427, 2007.
- RAHIM, R.; BURROWS, L.L.; MONTEIRO, M.A.; PERRY, M.B.; LAM, J.S. Involvement of the *rml* locus in core oligosaccharide and O polysaccharide assembly in *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbiology**. 146: 2803-2814, 2000.
- RAMPERSAUD, A., UTSUMI, R., DELGADO, J., FORSTS, S.A., INOUE, M. Ca<sup>2+</sup>-enhanced Phosphorylation of a Chimeric Protein Kinase Involved with Bacterial Signal Transduction. **J. Biolol. Chem.** 266(12): 7633-7637, 1991.
- REEVES, P.P., WANG, L. Genomic Organization of LPS-Specific Loci. **Curr. Top. Microbiol. Immunobio.** 264: 109-135, 2006.
- REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T. Life in grasses: diazotrophic endophytes. **Trends Microbiol.** 6: 139-144, 1998.
- REUHS, B.L.; STEPHENS, S.B.; GELLER, D.P.; KIM, J.S.; GLENN, J.; PRZYTICKI, J.; OJANEN-REUHS, T. Epitope identification for a panel of anti-*Sinorhizobium meliloti* monoclonal antibodies and application to the analysis of K antigens and Lipopolysaccharides from bacterioids. **Appl. Environ. Microbiol.** 65: 5186-5191, 1999.
- RIDLEY, B.L. Plant cell wall and bacterial cell surface polysaccharides in plant-microbe interactions: the role of oligogalacturonides and lipopolysaccharides. **The University of Georgia**, Athens, Ga, USA, 2000.

- RINAUDI, L.V.; GONZÁLEZ, J.E. The low-molecular-weight fraction of exopolysaccharide II from *Sinorhizobium meliloti* is a crucial determinant of biofilm formation. **J. Bacteriol.** 191: 7216–7224, 2009.
- ROBERSON, E.; FIRESTONE, M. Relationship between desiccation and exopolysaccharide production by soil *Pseudomonas* sp. **Appl. Environ. Microbiol.** 58: 1284-91, 1992.
- ROJAS, C.M.; HAM, J.H.; DENG, W.L.; DOYLE, J.J.; COLLMER, A. HecA, a member of a class of adhesins produced by diverse pathogenic bacteria, contributes to the attachment, aggregation, epidermal cell killing, and virulence phenotypes of *Erwinia chrysanthemi* EC16 on *Nicotiana clevelandii* seedlings. **PNAS.** 99:13142-13147, 2002.
- ROLFE, B.G.; CARLSON, R.W.; RIDGE, R.W.; DAZZO, R.W.; MATEOS, F.B.; PANKHURST, C.E. Defective infection and nodulation of clovers by exopolysaccharide mutants of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. **Aust. J. Plant Physiol.** 23: 285–303, 1996.
- RONCATO-MACARI, L.D.B.; RAMOS, H.J.O.; PEDROSA, F.O.; ALQUINI, Y.; YATES, M.G.; RIGO, L.U.; STEFFENS, M.B.R.; SOUZA, E.M. Endophytic *Herbaspirillum seropedicae* expresses *nif* gene in gramineous plants. **FEMS Microbiol. Ecol.** 45: 39-47, 2003
- ROPER, M.C.; GREVE, L.C.; LABAVITCH, J.M.; KIRKPATRICK, B.C. Detection and visualization of an exopolysaccharide produced by *Xylella fastidiosa* *in vitro* and in planta. **Appl. Environ. Microbiol.** 73: 7252–7258. 2007,
- ROSENBLUETH, M.; MARTINEZ-ROMERO, E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. **Mol. Plant-Microbe Interact.** 19:827-837, 2006.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning a laboratory manual.** 2 ed. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- SAMUEL, G., REEVES, P. Biosynthesis of O-antigens: genes and pathways involved in nucleotide sugar precursor synthesis and O-antigen assembly. **Carboh. Res.** 338: 2503-2519, 2003.

- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 74: 5463–7, 1977.
- SANTI, C.; BOGUSZ, D.; FRANCHE, C. Biological nitrogen fixation in non-legume plants. **Ann Bot.** 111: 743-67, 2013.
- SAUER, K.; CAMPER, A.K.; EHRLICH, G.D.; COSTERTON, J.W.; DAVIES, D.G. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. **J. Bacteriol.** 184:1140–54, 2002.
- SERRATO, R.V. Caracterização química e estrutural de exopolissacarídeos e lipopolissacarídeos produzidos por bactérias diazotróficas endofíticas. **Tese de Doutorado**. Programa de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR, Curitiba, p. 143, 2008.
- SERRATO, R.V.; Balsanelli, E.; Sassaki, G.L.; et al. Structural analysis of *Herbaspirillum seropedicae* lipid-A and of two mutants defective to colonize maize roots. **Int J Biol Macromol** dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.05.034, 2012.
- SESSITSCH, A.; HOWIESON, J.G.; PERRET, X.; ANTOUN, H.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Advances in *Rhizobium* research. **Crit. Ver. Plant Sci.** 21:323-378, 2002.
- SHARON, N. **Complex carbohydrates. Their chemistry, biosynthesis and functions**. Ed. Addison-Wesley Publish Co. p. 129, 1975.
- SHEVCHENKO, A.; WILM, M.; VORM, O.; MANN, M. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. **Analytical Chemistry** 68:850-858, 1996.
- SILVERMAN, M.; SIMON, M. Flagellar rotation and the mechanism of bacterial motility. **Nature** 249:73–74, 1974.
- SIMON, R.; PRIEFER, U.; PÜHLER, A. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. **Nat. Biotechnol.** 1:784-791, 1983.
- SIMPSON, F.B.; BURRIS, R.H. A nitrogen pressure of 50 atmospheres does not prevent evolution of hydrogen by nitrogenase. **Science**, 224: 1095-96, 1984.



- SKORUPSKA, A.; JANCZAREK, M.; MARCZAK, M.; MAZUR, A.; KRÓL, J. Rhizobial exopolysaccharides: genetic control and symbiotic functions. **Microbial Cell Fact.** 5:7, 2006.
- SMITH, A.R.W.; MUNRO, S.M. WAIT, R.; HIGNETT, R.C. Effect on lipopolysaccharide structure of aeration during growth of a plum isolated of *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum*. **Microbiology**, 140: 1585-1593, 1994.
- SMOL'KINA, O.N.; SHISHONKOVAA, N.S.; YURASOV, N.A.; IGNATOV, V.V. Capsular and Extracellular Polysaccharides of the Diazotrophic Rhizobacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z78. **Microbiology**, 81: 317–323, 2012.
- SNEL, B.; LEHMANN, G.; BORK, P.; HUYNEN, M.A. STRING: a web-server to retrieve and display the repeatedly occurring neighbourhood of a gene. **Nucleic Acids Reser.** 28: 3442-44, 2000.
- SOUZA, E. M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L.U.; PEDROSA, F.O. Cloning and characterization of the *nifA* gene from *Herbaspirillum seropedicae* strain Z78. **Canadian Journal of Microbiology**. 37(6):425-429, 1991.
- SOUZA, E.M. Clonagem, caracterização e sequenciamento dos genes *nifA* e *nifB* de *Herbaspirillum seropedicae*. **Tese de Doutorado**. Programa de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR, Curitiba, p. 260, 1990.
- SPAINK, H.P.; OKKER, R.J.; WIJFFELMAN, C.A.; PEES, E.; LUGTENBERG, B.J.J. Promoters in the nodulation region of the *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmid pRL1J1. **Plant Mol. Biol.** 9:27-39, 1987.
- STACEY, G., MCALVIN, C.B., KIM, S.Y., OLIVARES, J., SOTO, M.J. Effects of endogenous salicylic acid on nodulation in the model legumes *Lotus japonicus* and *Medicago truncatula*. **Plant. Physiol.** 141:1473–1481, 2006.
- STAEHELIN, C.; FORSBERG, L.S.; D'HAENZE, W.; GAO, M.; CARLSON, R.W.; XIE, Z.; PELLOCK, B.; JONES, K.M.; WALKER, G.C.; STREIT, W.R.; BROUGHTON, W.J. Exo-Oligosaccharides of *Rhizobium* sp strain NGR234 Are Required for Symbiosis with Various Legumes. **J. Bacteriol.** 188: 6168-6178, 2006.

- STEENHOUDT, O.; VANDERLEYDEN, J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **FEMS Microbiology Reviews** 24:487–506, 2000.
- STEWART, P. S. & FRANKLIN, M. J. Physiological heterogeneity in biofilms. **Nature Rev. Microbiol.** 6, 199–210, 2008.
- STOLTZFUS, J.R.; SO, R.; MALARVITHI, P.P.; LADHA, J.K.; BRUIJIN, F.J. Isolation of endophytic bacteria from rice and assessment of their potential for supplying rice with biologically fixed nitrogen. **Plant and Soil.** 194: 25-36, 1997.
- STOODLEY, P.; SAUER, K.; DAVIES, D.G.; COSTERTON, J.W. Biofilms as complex differentiated communities. **Annu. Rev. Microbiol.** 56:187–209, 2002.
- STURZ, A.V.; CHRISTIE, B.R.; NOWAK, J. Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production. **CRC Crit. Rev. Plant Sci.** 19:1-30, 2000.
- SUTHERLAND, I. W. Biosynthesis and composition of gram-negative bacterial extracellular and wall polysaccharides. **Ann. Rev. Microbiol.** 39: 243-270, 1985.
- SUTHERLAND, I. W. Biosynthesis of microbial exopolysaccharides. **Ann. Rev. Microbiol.** 34: 79-150, 1980.
- SUTHERLAND, I. W. The biofilm matrix: an immobilized but dynamic microbial environment. **Trends Microbiol.** 9: 222-227, 2001.
- TADRA-SFEIR, M.Z.; SOUZA, E.M.; FAORO, H.; MÜLLER-SANTOS, M.; BAURA, V.A.; TULESKI, T.R.; RIGO, L.U.; YATES, M.G.; WASSEM, R.; PEDROSA, F.O.; MONTEIRO, R.A. Naringenin regulates expression of genes involved in cell wall synthesis in *Herbaspirillum seropedicae*. **Appl. Environ. Microbiol.** 77:2180-2183, 2011.
- TAGUCHI, F.; SHIMIZU, R.; NAKAJIMA, R.; TOYODA, K.; SHIRAISHI, T.; ICHINOSE, Y. Differential effects of flagellins from *Pseudomonas syringae* pvs. *tabaci*, *tomato* and *glycinea* on plant defense response. **Plant Physiol. Biochem.** 41:165–174, 2003.

- TAO, H.; BREWIN, N.J.; NOEL, K.D. *Rhizobium leguminosarum* CFN42 lipopolysaccharide antigenic changes induced by environmental conditions. **J. Bacteriol.** 174: 2222-2229, 1992.
- TOLKER-NIELSON, T.; BRINCH, U.C.; RAGAS, P.C.; ANDERSEN, J.B.; JACOBSEN, C.S.; MOLIN, S. Development and dynamics of *Pseudomonas* sp. biofilms. **J. Bacteriol.** 182:6482–89, 2000.
- TOMLINSON, A.D.; RAMEY-HARTUNG, B.; DAY, T.W.; MERRITT, P.M.; FUQUA, C. *Agrobacterium tumefaciens* ExoR represses succinoglycan biosynthesis and is required for biofilm formation and motility. **Microbiology** 156: 2670–2681, 2010.
- TORRES, P.S.; MALAMUD, F.; RIGANO, L.A.; RUSSO, D.M.; MARANO, M.R.; *et al.* Controlled synthesis of the DSF cell-cell signal is required for biofilm formation and virulence in *Xanthomonas campestris*. **Environ. Microbiol.** 9: 2101–2109, 2007.
- TORTORA, G.J.; CASE, C.L.; FUNKE, B.R. **Microbiologia**. Artmed. Ed. 8, 920 p., 2005.
- TSAI, C., FRISCH, C. E. 1982. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. **Anal. Biochem.** 119:115-119.
- UEDA, T., SUGA, Y., YAHIRO, N., MATSUGUSHI, E.T. Remarkable N<sub>2</sub>-fixing bacterial diversity detected in rice roots by molecular evolutionary analysis of *nifH* gene sequences. **J. Bacteriol.** 177: 1414-1417, 1995.
- URQUIAGA, S.; CRUZ, K.H.S.; BODDEY, R.M. Contribution of nitrogen fixation to sugar cane: nitrogen-15 and nitrogen balance estimates. **Soil Sci. Soc. Am. J.** 56: 105-114, 1992.
- VALVANO, M.A. Export of O-specific lipopolysaccharide. **Front. Biosci.** 8: 452-471, 2003.
- VAN WORKUM, W.A.T.; VAN SLAGEREN, S.; VAN BRUSSEL, A.A.N.; KIJNE, J.W. Role of exopolysaccharides of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* as host plant specific molecules required for infection thread formation during nodulation of *Vicia sativa*. **Mol. Plant Microbe Interact.** 11: 1233–1241, 1998.
- VANDEVIVERE, P.; KIRCHMAN, D.L. Attachment Stimulates Exopolysaccharide Synthesis by a Bacterium. **Appl. Environ. Microbiol.** 59:3280-3286, 1993.

- WANG, P.; ZHONG, Z.; ZHOU, J.; CAI, T.; ZHU, J. Exopolysaccharide biosynthesis is important for *Mesorhizobium tianshanense*: Plant host interaction. **Arch. Microbiol.** 189: 525–530, 2008.
- WELLER, D.M. Biological control of soilborne plant pathogens in the rizhosphere with bactéria. **Annu. Rev. Phytopathol.** 26: 379-407, 1988.
- WESTPHAL, O., e JANN, K. Bacterial lipopolysaccharides: extraction with phenol-water and further applications of the procedure. **Methods. Carbohydr. Chem.** 5: 83-91, 1965.
- WHITFIELD, C. Biosynthesis and Assembly of Capsular Polysaccharides in *Escherichia coli*. **Annual Review of Biochemistry.** 75: 39-68, 2006.
- WU, P., ZHANG, G., LADHA, J.K., MCCOUCH, S.R., HUANG, E.N. Molecular-marker-facilitated investigation on the ability to stimulate N<sub>2</sub> fixation in the rizosphere by irrigated rice plants. **Theor. Appl. Genet.** 91: 1171-1183, 1995.
- XU, H.X., e LEE, S.F. Activity of plant flavonoids against antibiotic-resistant bacteria. **Phytotherapy Research.** 15 (1): 39 – 43, 2001.
- YOSHIDA, T.; AYABE, T., HORINOUCI, M., HABE, H., NOJIRI, H.; OMORI, T. Saccharide production from methanol by Tn5-mutants derived from the extracellular polysaccharide-producing bacterium *Methylobacillus* sp. strain 12S. **Appl Microbiol Biotechnol** 54:341–347, 2000.
- YOSHIDA, T.; AYABE, Y.; YASUNAGA, M.; USAMI, Y.; HABE, H.; NOJIRI, H.; OMORI, T. Genes involved in the synthesis of the exopolysaccharide methanolan by the obligate methylotroph *Methylobacillus* sp strain 12S. **Microbiol.** 149: 431-444, 2003.
- YOUNG, J.P.W. Phylogenetic Classification of Nitrogen-Fixing Organisms. In: **Biological Nitrogen Fixation**. Ed. G. STACEY, R.M. BURRIS, H.S. EVANS. London Chapman & Hall, p. 43-86, 1992.
- YUAN, Z.; EDLING, M.P.; SAENKHAM, P.; BANTA, L.M.; WISE, A.A.; RONZONE, E.; BINNS, A.N.; KERR, K.; NESTER, E.W. The plant signal salicylic acid shuts down expression of the *vir* regulon and activates quormone-quenching genes in *Agrobacterium*. **PNAS**, 104: 11790-795, 2007.

ZÄHRINGER, U.; LINDNER, B.; RIETSCHER, E.T. Endotoxin in Health and Disease.

In: **Endotoxins**. Ed. H. BRADY, S.M. OPAL, S.N. VOGEL, D.C. MORRISON.

Marcel Dekker Inc. p 93-114, 1999.

ZIPFEL, C. *et al.* Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception. **Nature** 428: 764–767, 2004.

ANEXO 1. Composição do meio de cultura Nfb-malato (KLASSEN *et al.*, 1997).

MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2 x 10 <sup>-1</sup> g/L
NaCl	1 x 10 <sup>-1</sup> g/L
CaCl <sub>2</sub>	2 x 10 <sup>-2</sup> g/L
Ácido nitrilo-triacético (NTA)	5,6 x 10 <sup>-2</sup> g/L
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2 x 10 <sup>-2</sup> g/L
Biotina	1 x 10 <sup>-4</sup> g/L
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	1 g/L
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	1,175 g/L
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1,4 g/L
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	4 x 10 <sup>-2</sup> g/L
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1,2 x 10 <sup>-1</sup> g/L
Malato de sódio	5 g/L

No momento do inóculo serão adicionados 50 mmol/L de solução de fosfatos (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 17,8 g/L; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 159,5 g/L), e 20mmol/L de cloreto de amônio.

ANEXO 2. Composição do meio de cultura LB (SAMBROOK *et al.*, 1989).

Triptona	10 g/L
Extrato de Levedura	5 g/L
NaCl	10 g/L

ANEXO 3. Composição do meio de cultura TB (SAMBROOK *et al.*, 1989).

Triptona	12 g/L
Extrato de Levedura	24 g/L
Glicerol	4 g/L

ANEXO 4. Similaridades de sequência entre as proteínas propostas de *H. seropedicae* e outras enzimas da biossíntese de LPS (1° hit do BLAST).

Proteínas de <i>H. seropedicae</i>	Organismo	Identidade /		Referência <sup>b</sup>
		Similaridade (%) <sup>a</sup>	Função proposta	
Biossíntese e exportação de antígeno-O				
WaaL (Hsero_3570)	<i>Marinomonas mediterranea</i> MMB-1	34 / 54	Lipídeo-A:core – O-antígeno ligase	[YP_004311767.1]
RfaJ (Hsero_3568)	<i>Ralstonia eutropha</i> JMP134	48 / 65	UDP-glucose:lipopolissacarídeo glucosiltransferase	[YP_296763.1]
RfaJ2 (Hsero_3569)	<i>Ralstonia eutropha</i> JMP134	77 / 86	UDP-glucose:lipopolissacarídeo glucosiltransferase	[YP_296763.1]
Hsero_3567	<i>Ralstonia eutropha</i> JMP134	77 / 84	UDP-heptose:lipopolissacarídeo glucosiltransferase	[YP_296762.1]
Hsero_3566	<i>Janthinobacterium</i> sp. CG3	78 / 88	Sistema de transporte tipo ABC, ATPase e permease	[WP_017877143.1]
RfaL (Hsero_3565)	<i>Aggregatibacter aphrophilus</i> NJ8700	31 / 51	Lipídeo-A-core ligase	[YP_003008144.1]
Biossíntese do lipídeo-A				
LpxA (Hsero_2190)	<i>Janthinobacterium</i> sp. Marseille	80 / 87	UDP-N-acetilglucosamina O-aciltransferase	[YP_001353736.1]
LpxB (Hsero_2191)	<i>Herminiimonas arsenicoxydans</i>	68 / 80	lipídeo-A-dissacarídeo sintase	[YP_001099648.1]
LpxC (Hsero_0343)	<i>Janthinobacterium</i> sp. Marseille	81 / 90	UDP-3-O-[3-hidroximiristoil] -N-acetilglucosamine deacetilase	[YP_001354698.1]

LpxD (Hsero_4206)	<i>Hermiimonas arsenicoxydans</i>	70 / 79	UDP-3-O-[3-hidroximiristoil] glucosamina N-aciltransferase	[YP_001099645.1]
LpxH (Hsero_1865)	<i>Oxalobacteraceae bacterium</i> IMCC9480	60 / 73	UDP-2,3-diacilglucosamina hidrolase	[EGF32172.1]
LpxK (Hsero_1169)	<i>Janthinobacterium</i> sp. Marseille	60 / 70	Tetraacildissacarídeo 4'- quiinase	[YP_001354269.1]
LpxL (Hsero_4291)	<i>Janthinobacterium</i> sp. Marseille	69 / 78	Lipídeo-A lauril-aciltransferase	[YP_001354890.1]
LpxL2 (Hsero_4292)	<i>Janthinobacterium</i> sp. Marseille	66 / 77	Lipídeo-A lauril-aciltransferase	[YP_001354890.1]
WaaA (Hsero_0475)	<i>Collimonas</i> sp. MPS11E8	62 / 74	KDO transferase	[ADU90688.1]

#### Exportação do LPS

Wza (Hsero_2761)	<i>Nitrosomonas europaea</i> ATCC19718	60 / 76	Exportação de polissacarídeos da membrana externa	[NP_841833.1]
MsbA (Hsero_3566)	<i>Hermiimonas arsenicoxydans</i>	69 / 84	Lipídeo-A flipase	[YP_001098803.1]
Wzt (Hsero_4446)	<i>Rahnella</i> sp. Y9602	55 / 75	Transportador de açúcar tipo ABC - ATPase	[YP_004215474.1]
Wzm (Hsero_4445)	<i>Agrobacterium vitis</i> S4	55 / 72	Transportador de açúcar tipo ABC - permease	[YP_002547955.1]
Wzm2 (Hsero_4444)	<i>Agrobacterium radiobacter</i> K8	52 / 70	Transportador de açúcar tipo ABC - permease	[YP_002541460.1]
Hsero_4447	<i>Leptothrix cholodnii</i> SP-6	70 / 85	Transportador de açúcar tipo ABC - periplasmático	[YP_001791243.1]

<sup>a</sup> Os alinhamentos das proteínas foram realizados pelo programa PSI-Blastp no site do NCBI (<http://ncbi.nlm.gov/BLAST/>). Percentagem em relação ao tamanho da sequência.

<sup>b</sup> Número de acesso do banco de dados SwissProt.



ANEXO 5. Similaridades de sequência entre as proteínas propostas de *H. seropedicae* e outras enzimas da biossíntese de EPS (1° hit do BLAST).

Proteínas de <i>H. seropedicae</i>	Organismo	Identidade /		Referência <sup>b</sup>
		Similaridade (%) <sup>a</sup>	Função proposta	
YcgE (Hsero_1984)	<i>Herminiimonas arsenicoxydans</i>	72 / 81	Regulador transcricional MerR	YP_001100074.1
Hsero_1985	<i>Azospirillum</i> sp. B510	49 / 58	Acetiltransferase	YP_003448716.1
Hsero_1986	<i>Oxalobacteraceae bacterium</i> IMCC9480	36 / 53	Fosfoesterase	ZP_08273296.1
EpsL (Hsero_1987)	<i>Herminiimonas arsenicoxydans</i>	40 / 56	Biossíntese de EPS	YP_001099033.1
EpsB (Hsero_1988)	<i>Oxalobacteraceae bacterium</i> IMCC9480	60 / 76	Glucosiltransferase	EGF30644.1
EpsD (Hsero_1989)	<i>Nitrosomonas</i> sp. AL212	36 / 61	Peptidil-prolil cis-trans isomerase	YP_004294361.1
EpsA (Hsero_1990)	<i>Janthinobacterium</i> sp. Marseille	58 / 78	Proteína de membrana externa de exportação de polissacarídeo	YP_001352322.1
EpsF (Hsero_1991)	<i>Janthinobacterium</i> sp. Marseille	52 / 70	Proteína determinante de tamanho de cadeia	YP_003049226.1
EpsG (Hsero_1992)	<i>Oxalobacteraceae bacterium</i> IMCC9480	59 / 76	Glucosiltransferase	EGF32585.1
EpsH (Hsero_1993)	<i>Oxalobacteraceae bacterium</i> IMCC9480	54 / 68	Exosortase 2	EGF32586.1
EpsM (Hsero_1994)	<i>Janthinobacterium</i> sp. Marseille	50 / 69	Biossíntese de EPS	YP_001352327.1
RfaG (Hsero_1995)	<i>Pseudomonas putida</i> H8234	67 / 77	Glucosiltransferase	AGN79251.1
Hsero_1996	<i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS 278	49 / 64	Aciltransferase	YP_001206761.1
Hsero_1997	<i>Acidovorax</i> sp. MR-S7	42 / 56	O-antígeno acetilase	GAD21245.1
Hsero_1998	<i>Janthinobacterium</i> sp. Marseille	58 / 70	Hipotética conservada	YP_001352329.1

EpsO (Hsero_1999)	<i>Herminiimonas arsenicoxydans</i>	53 / 68	Glucosiltransferase	YP_001099045.1
EpsP (Hsero_2000)	<i>Herminiimonas arsenicoxydans</i>	56 / 69	Glucosiltransferase	CAL60919.2
EpsQ (Hsero_2001)	<i>Herminiimonas arsenicoxydans</i>	70 / 83	GDP-mannose pirofosforilase	CAL60922.2
EpsK (Hsero_2002)	<i>Methylovorus</i> sp. MP688	43 / 58	Glucosiltransferase	YP_004040208.1
Ugd (Hsero_2003)	<i>Ralstonia solanacearum</i> PSI07	73 / 84	UDP-glucose 6-dehidrogenase	YP_003753104.1
Hsero_2004	<i>Sphingobium chlorophenolicum</i> L-1	44 / 61	Glucosiltransferase	ZP_07574652.1
WzxC (Hsero_2005)	<i>Oxalobacteraceae bacterium</i> IMCC9480	61 / 79	Polissacarídeo flipase	EGF32588.1
EpsJ (Hsero_2006)	<i>Burkholderia phymatum</i> STM815	43 / 61	Glucosiltransferase	YP_001862793.1
Hsero_2007	<i>Pseudomonas protegens</i> Pf-5	34 / 50	Aciltransferase	YP_261319.1
Hsero_2008	Sem hits		Hipotética	
Hsero_2009	<i>Herminiimonas arsenicoxydans</i>	68 / 82	O-antígeno acetiltransferase	YP_001099043.1
EpsS (Hsero_2010)	<i>Janthinobacterium</i> sp. Marseille	71 / 85	UDP-glucose 4-epimerase	YP_001352334.1
Hsero_2011	<i>Herminiimonas arsenicoxydans</i>	68 / 80	Glucosiltransferase	YP_001099039.1

<sup>a</sup> Os alinhamentos das proteínas foram realizados pelo programa PSI-Blastp no site do NCBI (<http://ncbi.nlm.gov/BLAST/>). Percentagem em relação ao tamanho da sequência.

<sup>b</sup> Número de acesso do banco de dados SwissProt.

ANEXO 6. Mapa de calor da expressão dos genes de metabolismo de nitrogênio de *H. seropedicae*.





MAPA EXPRESSO EM LOG DO MÓDULO DA DIFERENÇA DE EXPRESSÃO. P1: CÉLULAS PLANTÔNICAS 1 D.A.I. P3: CÉLULAS PLANTÔNICAS 3 D.A.I. A1: CÉLULAS ADERIDAS 1 D.A.I. A3: CÉLULAS ADERIDAS 3 D.A.I. MM: CÉLULAS CRESCIDAS EM MEIO NFBHPN.

## ANEXO 7. Produção bibliográfica

- Balsanelli, E., Tadra-Sfeir, M.Z., Faoro, H., Baura, V., Yates, G.M., Pedrosa, F.P., Souza, E.M., Monteiro, R.A. Adaptations of *H. seropedicae* for maize rhizosphere colonization. Em preparação.
- Balsanelli, E., Baura, V., Yates, G.M., Pedrosa, F.P., Souza, E.M., Monteiro, R.A. Mature biofilm formation is not necessary for plant colonization by *Herbaspirillum seropedicae*. Em preparação.
- Balsanelli, E., Tuleski, T., Baura, V., et al. Maize root lectins mediate the interaction with *Herbaspirillum seropedicae* via N-acetyl glucosamine residues of lipopolysaccharides. **PLoS One**, 8(10): e77001, 2013.
- Balsanelli, E., Serrato, R.V., Pedrosa, F.O., Souza, E.M., Monteiro, R.A. Role of *Herbaspirillum seropedicae* LPS in plant colonization. In: Bruijn, F.J., ed. Biological Nitrogen Fixation. Wiley/Blackwell, In press, 2013.
- Serrato RV, Balsanelli E, Sasaki GL, Carlson RW, Muszynski A, Monteiro RA, Pedrosa FO, Souza EM, Iacomini M. Structural analysis of *Herbaspirillum seropedicae* lipid-A and of two mutants defective to colonize maize roots. **Int J Biol Macromol** dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.05.034, 2012.
- Schmidt, M.A., Balsanelli, E., Faoro, H., et al. The type III secretion system is necessary for the development of a pathogenic and endophytic interaction of *Herbaspirillum rubrisubalbicans* and Gramineae. **BMC Microbiology**, 12: DOI 10.1186/1471-2180-12-98, 2012.
- Rose A. Monteiro, Eduardo Balsanelli, Thalita Tuleski, et al. Genomic comparison of the endophyte *Herbaspirillum seropedicae* SMRI and the phytopathogen *Herbaspirillum rubrisubalbicans* M1 by Suppressive Subtractive Hybridization and partial genome sequencing. **FEMS Microbiology Ecology**, 80(2):441-51, 2012.
- Rose Adele Monteiro, Eduardo Balsanelli, Roseli Wassem, Anelis M. Marin, Liziane C. C. Brusamarello-Santos, Maria Augusta Schmidt, Michelle Z. Tadra-Sfeir, Vânia C. S. Pankievicz, Leonardo M. Cruz , Leda S. Chubatsu, Fabio O. Pedrosa, Emanuel M. Souza. *Herbaspirillum*-plant interactions: microscopical, histological and molecular aspects. **Plant and Soil**, DOI 10.1007/s11104-012-1125-7, 2012.



Pedrosa, Fábio O., Monteiro, Rose Adele, Wassem, Roseli, Cruz, Leonardo M., Ayub, Ricardo A., Colauto, Nelson B., Fernandez, Maria Aparecida, Fungaro, Maria Helena P., Grisard, Edmundo C., Hungria, Mariangela, Madeira, Humberto M. F., Nodari, Rubens O., Osaku, Clarice A., Petzl-Erler, Maria Luiza, Terenzi, Hernán, Vieira, Luiz G. E., Steffens, Maria Berenice R., Weiss, Vinicius A., Pereira, Luiz F. P., Almeida, Marina I. M., Alves, Lysangela R., Marin, Anelis, Araujo, Luiza Maria, Balsanelli, Eduardo, et al. Genome of *Herbaspirillum seropedicae* Strain SmR1, a Specialized Diazotrophic Endophyte of Tropical Grasses. **PLoS Genetics**. v.7, p.e1002064, 2011.